



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG**  
**Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – CEP 37130-001 - Alfenas/MG  
Fone: (35)3701-9720 - [pgquimica@unifal-mg.edu.br](mailto:pgquimica@unifal-mg.edu.br)



**JOHAN MATEO RIOS MARIN**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO CAFÉ COMO FONTES DE  
ENZIMAS E ANTIMICROBIANOS**

**ALFENAS-MG**

**2025**

**JOHAN MATEO RIOS MARIN**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO CAFÉ COMO FONTES DE  
ENZIMAS E ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jaine Honorata Hortolan Luiz. Coorientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes.

**ALFENAS-MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Rios Marin, Johan Mateo.

Bioprospecção de fungos endofíticos do café como fontes de enzimas e antimicrobianos / Johan Mateo Rios Marin. - Alfenas, MG, 2025.

81 f. : il. -

Orientador(a): Jaine Honorata Hortolan Luiz .

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Coffea arabica. 2. Bioprospecção. 3. Atividade enzimática. 4. Atividade antimicrobiana . 5. Fungos endofíticos.. I. Hortolan Luiz , Jaine Honorata , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

JOHAN MATEO RIOS MARIN

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO CAFÉ COMO FONTES DE ENZIMAS E ANTIMICROBIANOS

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química.

Aprovado em: 01 de dezembro de 2025.

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Cecília Veronica Nunez

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA)

Prof. Dr. Bruno Alves Rocha

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)



Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior**, em 02/12/2025, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1682009** e o código CRC **3F60EACA**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço com todo o meu coração à minha mãe, Nayive Marin, por ser minha maior fortaleza, mesmo à distância. À minha irmã, Maria Fernanda Betancur, e à minha avó, Ofelia Ruiz (mi yeya), por representarem as mulheres que sempre me inspiraram a seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos. Ao melhor avô e mestre do mundo, Jose Fidel Marin Blandon, meu primeiro cientista e aquele que me ensinou a amar a natureza.

À minha orientadora, Dra. Jaine H. H. Luiz, por sua paciência no meu processo de adaptação, por compreender meu “portunhol” e confiar no meu trabalho desde o início. Obrigado por sua amizade, pelas trocas de conhecimento e por me incentivar a crescer não apenas como pesquisador, mas como pessoa. Minha gratidão e admiração são imensas.

Ao meu coorientador, Dr. Adriano, por compartilhar seus ensinamentos, escutar meus seminários no melhor portunhol possível, e sempre estar disponível para orientar com generosidade e atenção. À Dra. Patrícia Lunardelli, pelo apoio e aprendizado durante a construção da metodologia, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Keila Bossolani, por compartilhar comigo o conhecimento científico por trás de uma boa xícara de café, e por abrir as portas de um espaço onde me senti acolhido — um lugar que, junto com bons cafés, me deu energia e inspiração para escrever este trabalho com carinho e dedicação.

Aos técnicos Gustavo e Bárbara, do Laboratório de Bioprocessos, por toda ajuda e prontidão em atender às demandas do laboratório. Aos colegas Lucas e Hillary, pelo apoio no dia a dia. Um agradecimento especial à Lara Cristina e Fernanda, por caminhar comigo ao longo desta jornada e por ser parte fundamental na construção desta pesquisa.

Aos amigos que me acompanharam neste processo, em especial os estrangeiros, por compartilharmos juntos a experiência de “gringos no Brasil”, com todos os desafios, aprendizados e afetos que essa vivência trouxe.

Ao Camilo Arbeláez, minha eterna gratidão pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados e pelo cuidado durante uma fase importante da minha vida acadêmica e pessoal.

Agradeço também à UNIFAL-MG, ao Programa de Pós-Graduação em Química, aos professores e a todos os órgãos de fomento que tornam possível a formação científica de qualidade. Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento Código 001.

Por fim, um agradecimento mais que especial à minha família, pois tenho plena certeza de que os maiores ensinamentos que carrego na vida foram vocês que me deram. Amo vocês eternamente.

E, finalmente, agradeço à biologia, por me ensinar a ver o mundo com outros olhos e, assim como os fungos endofíticos, a entender que a cooperação mútua é uma forma poderosa de adaptação e sobrevivência.

A todos que fizeram parte desta caminhada, meu mais sincero obrigado.

*"La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian."*

**LYNN MARGULIS.**

## RESUMO

A bioprospecção de fungos endofíticos para a produção de compostos bioativos representa uma alternativa sustentável comparada a utilização de substâncias sintéticas. Diante do avanço da resistência antimicrobiana, da necessidade de novas descobertas e de soluções mais ecológicas nos diferentes setores produtivos, este trabalho teve como principal objetivo a avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a *Coffea arabica* L. para a produção de enzimas e compostos antimicrobianos. Quarenta e cinco fungos endofíticos foram isolados de folhas sadias coletadas em Alfenas e Campestre (MG, Brasil), atingindo uma frequência de isolamento de 56,3%. A caracterização morfológica preliminar revelou uma diversidade de fungos, incluindo estruturas compatíveis com *Aspergillus* spp. (código CfP4F3B2) e fungos produtores de pigmentos, presentes em 53,5% dos isolados. A triagem enzimática em meio sólido mostrou predominância de atividade lipolítica, na qual 76,7% dos isolados foram positivos para lipase utilizando Tween® 20, com destaque para os isolados CfP4F1B1 (IE=5,37), CfP4F3B2 (IE=4,81) e CfP4F3B1 (IE=4,50). As frequências de fungos com atividade proteolítica, celulolítica, pectinolítica e amilolítica foram de 37,2%, 25,6% e 2,3%, respectivamente, sendo a última a menos expressa. Na avaliação antimicrobiana, utilizando o método de bloco de ágar, o isolado CfP1F3A apresentou um halo de inibição de 33,8 mm, enquanto o isolado CfP3F1A1 apresentou um halo de 24,8 mm contra *Staphylococcus aureus*. O isolado CfP4F4A1 apresentou um halo de 15,2 mm contra *Candida albicans*, indicando atividade antifúngica. O fungo CfP1F3A foi selecionado para cultivo em meio estático e agitado. O cultivo estático favoreceu maior acúmulo de biomassa e metabólitos secundários. A análise cromatográfica por CCD dos extratos acetato de etila obtidos, revelou a presença de metabólitos sob luz UV e reativos ao anisaldeído e ao ácido fosfomolibdico, indicando substâncias com potencial bioatividades. Essas descobertas reforçam a importância biotecnológica dos fungos endofíticos de *Coffea arabica*, tanto para a produção de enzimas e antimicrobianos quanto para novos metabólitos de interesse industrial e farmacêutico.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, bioprospecção, atividade enzimática, atividade antimicrobiana e fungos endofíticos.

## ABSTRACT

Bioprospecting endophytic fungi for the production of bioactive compounds represents a sustainable alternative compared to the use of synthetic substances. Given the increasing antimicrobial resistance, the need for new discoveries, and more ecological solutions in different productive sectors, this work aimed to evaluate the biotechnological potential of endophytic fungi associated with *Coffea arabica* L. for the production of enzymes and antimicrobial compounds. Forty-five endophytic fungi were isolated from healthy leaves collected in Alfenas and Campestre (MG, Brazil), achieving an isolation frequency of 56.3%. Preliminary morphological characterization revealed a diversity of fungi, including structures compatible with *Aspergillus* spp. (code CfP4F3B2) and pigment-producing fungi, present in 53.5% of the isolates. Enzymatic screening on solid media showed a predominance of lipolytic activity: 76.7% of the isolates were positive for lipase using Tween® 20, with isolates CfP4F1B1 (IE=5.37), CfP4F3B2 (IE=4.81), and CfP4F3B1 (IE=4.50) standing out. The frequencies of fungi with proteolytic, cellulolytic, pectinolytic, and amylolytic activity were 37.2%, 25.6%, and 2.3%, respectively, with the latter being the least expressed. In the antimicrobial evaluation, using the agar block method, the CfP1F3A isolate showed a 33.8 mm inhibition halo, while the CfP3F1A1 isolate showed a 24.8 mm halo against *Staphylococcus aureus*. The CfP4F4A1 isolate showed a 15.2 mm halo against *Candida albicans*, indicating antifungal activity. The CfP1F3A fungus was selected for cultivation in static and stirred media. Static cultivation favored greater accumulation of biomass and secondary metabolites. TLC analysis of the ethyl acetate extracts revealed the presence of metabolites under UV light and reactive to anisaldehyde and phosphomolybdic acid, indicating substances with potential bioactivity. These findings reinforce the biotechnological potential of endophytic fungi from *Coffea arabica*, both for the production of enzymes and antimicrobials, and for new metabolites of industrial and pharmaceutical interest.

Keywords: *Coffea arabica*, bioprospecting, enzymatic activity, antimicrobial activity and endophytic fungi.

## RESUMEN

La bioprospección de hongos endófitos para la producción de compuestos bioactivos representa una alternativa sostenible en comparación con el uso de sustancias sintéticas. Dada la creciente resistencia a los antimicrobianos, la necesidad de nuevos descubrimientos y soluciones más ecológicas en diferentes sectores productivos, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial biotecnológico de los hongos endófitos asociados a *Coffea arabica* L. para la producción de enzimas y compuestos antimicrobianos. Se aislaron 45 hongos endofíticos de hojas sanas recolectadas en Alfenas y Campestre (MG, Brasil), alcanzando una frecuencia de aislamiento del 56,3%. La caracterización morfológica preliminar reveló una diversidad de hongos, incluidas estructuras compatibles con *Aspergillus* spp. (código CfP4F3B2) y productores de pigmentos, presentes en el 53,5 % de los aislados. El cribado enzimático en medio sólido presentó predominancia de actividad lipolítica: el 76,7% de los aislados fueron positivos para lipasa utilizando Tween® 20, destacándose los aislados CfP4F1B1 (IE=5,37), CfP4F3B2 (IE=4,81) y CfP4F3B1 (IE=4,50). Las frecuencias de hongos con actividad proteolítica, celulolítica, pectinolítica y amilolítica fueron del 37,2 %, 25,6 % y 2,3 %, respectivamente, siendo estas últimas las menos expresiva. En la evaluación antimicrobiana, mediante el método de agar en bloque, el aislado CfP1F3A presenta 33,8 mm de halo de inhibición, mientras que el aislado CfP3F1A1 mostró un halo de 24,8 mm frente a *Staphylococcus aureus*. El aislado CfP4F4A1 presenta un halo de 15,2 mm contra *Candida albicans*, lo que indica acción antifúngica. El aislado CfP1F3A bajo condiciones estáticas y agitadas evidenciaron que la fermentación estática favorece una mayor acumulación de biomasa y metabolitos secundarios. El análisis cromatográfico por CCD de los extractos obtenidos reveló la presencia de metabolitos visibles bajo luz UV y reactivos al anisaldeído y ácido fosfomolibdico, lo que indica sustancias con estructuras potencialmente activas. Estos hallazgos refuerzan el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos de *Coffea arabica*, tanto para la producción de enzimas e inhibidores antimicrobianos como para nuevos metabolitos de interés industrial y farmacéutico.

Palabras claves: *Coffea arabica*, bioprospección, actividad enzimática, actividad antimicrobiana y hongos endófitos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação entre plantas e microrganismos endofíticos. ....	21
Figura 2 – Enzimas de fungos endofíticos do Cafeeiro: Aplicações Biotecnológicas.....	30
Figura 3 - Sistema de codificação dos isolados fúngicos endofíticos obtidos de <i>Coffea arabica</i> . Adaptado de Silva, 2024 e Marin, Silva e Luiz, 2024. ....	32
Figura 4 - Procedimento para isolamento de fungos endofíticos de <i>Coffea arabica</i> . ....	33
Figura 5 - Representação esquemática da hidrólise enzimática dos surfactantes Tween® 20 (A) e Tween® 80 (B) por lipases e formação dos respectivos sais de cálcio. ....	37
Figura 6 - Fluxograma com as avaliações enzimáticas de fungos endofíticos isolados de <i>Coffea arabica</i> . ....	38
Figura 7 - Sistema de codificação dos extratos obtidos do fungo CfP1F3A. ....	41
Figura 8 - Observações microscópicas de micélio e estruturas conidiais em isolados de fungos endofíticos.....	43
Figura 9 - Morfologia da estrutura do fungo endofítico CfP3F1A1. ....	44
Figura 10 – Fotografias de fungos endofíticos isolados de café (2022 - 2025). ....	46
Figura 11– Fotografia de placas indicando as atividades enzimática de fungos endofíticos isolados de <i>Coffea arabica</i> .....	51
Figura 12. Interação bioquímica planta-fungo durante a colonização endofítica em <i>C. arabica</i> . ....	53
Figura 13. Esquema do mecanismo de ação em ziguezague de fungos endofíticos associados à <i>C. arabica</i> na ativação de respostas defensivas e proteção foliar.....	54
Figura 14- Fotografias de placas Petri com a presença de halos de inibição contra <i>S. aureus</i> por endófitos de café. .....	58
Figura 15 - Halos de inibição de <i>C. albicans</i> para endófitos de café. ....	59
Figura 16 - Co-cultura dos fungos endofíticos CfP1F3A e CfP3F1A1. ....	60
Figura 17 - Perfil cromatográfico dos extratos por CCD.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção mundial e principais países produtores de café. ....	23
Tabela 2 - Quadro de classificação internacional de enzimas. ....	27
Tabela 3- Frequência de isolamento de fungos endofíticos por fragmento foliar 2022 – 2025.....	42
Tabela 4- Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos de Coffea arabica. ....	48
Tabela 5- Índice de atividade antimicrobiana e antifúngica dos fungos endofíticos isolados. ....	56
Tabela 6 - Variáveis de cultivo, biomassa do endófito (g) e massas dos extratos AcOEt (mg) obtidas a partir do caldo de cultivo e do micélio após diferentes dias de fermentação. ....	63
Tabela 7 - Valores de Rf obtidos para os extratos CfP1F3A em diferentes métodos de visualização na CCD.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Frequência da atividade enzimática da lipase, esterase, amilase, celulase, protease e pectato liase para os endófitos isolados de <i>C. arabica</i> .....	51
Gráfico 2- Produção e variabilidade da atividade enzimática de fungos endofíticos de café.....	53
Gráfico 3- Variações do pH do meio de cultivo durante o crescimento do fungo CfP1F3A em condições estáticas e agitadas. ....	63
Gráfico 4 - Dinâmica da produção de biomassa e metabólitos secundários (extrato AcOEt) do fungo endofítico CfP1F3A.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Agar Batata Dextrose
ABIC	Associação Brasileira Da Industria de Café.
AcOEt	Acetato de etila
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Commisson
EtOH	Etanol
Fig	Figura
FNNC	Federación Nacional de Cafeteros.
g/L	grama/litro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice de Enzimas
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotássico
L	Litro
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	milímetro
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Hidrogenofosfato de sódio heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio

NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sódio
OIC	Organização Internacional do Café
PIB	Produto Interno Bruto
Rf	Retention fator (Fator de retenção)
ARN	Ácido ribonucleico
Tween	Monolaurato de sorbitano polioxietilenado (T-20)
UV	Radiação ultravioleta
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µm	Micrometro
µmol	Micromol
µL	Microlitro
%	Porcentagem

## SUMÁRIO-

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos .....	19
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1.	Fungos Endofíticos.....	20
3.2.	Relevância e características das espécies de <i>Coffea</i> .....	22
3.3.	Fungos endofíticos do café e seus metabólitos secundários.....	25
3.4.	Enzimas e suas aplicações.....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1.	Material .....	31
4.2.	Métodos.....	31
<b>4.2.1</b>	<b>Desinfestação das amostras vegetais para isolamento de endófitos</b> .....	<b>32</b>
4.2.2	Preservação e reativação dos fungos.....	33
<b>4.2.2.1</b>	<b>Caracterização morfológica de dois fungos endofíticos</b> .....	<b>33</b>
4.2.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
<b>4.2.3.</b>	<b>Avaliação das atividades enzimáticas</b> .....	<b>35</b>
4.2.3.1	Atividade amilolítica (amilase).....	35
4.2.3.2	Atividade celulolítica (celulase).....	35
4.2.3.3	Atividade lipolítica (lipase) e esterase.....	36
4.2.3.4	Atividade pectinolítica (pectinase).....	37
4.2.3.5	Atividade proteolítica (protease).....	38
<b>4.2.4</b>	<b>Determinação do índice enzimático (IE)</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Triagem antimicrobiana: Método do ágar em bloco</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Co-cultivo aplicado a fungos endofíticos</b> .....	<b>40</b>
4.3	Cultivo de fungo endofítico em meio líquido Czapek.....	40
<b>4.3.1</b>	<b>Obtenção de extratos orgânicos secos</b> .....	<b>41</b>
4.4	Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	42
5.1.	Isolamento e caracterização morfológica preliminar dos fungos endofíticos.....	42
5.2.	Diversidade de pigmentos em fungos endofíticos isolados de café.....	46
5.3.	Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados fúngicos.....	48
5.4	Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método do ágar em bloco.....	55
5.5	Co-cultura de isolados endofíticos de café com atividade antimicrobiana.....	59
5.6	Caracterização dos extratos de acetato de etila obtidos por fermentação estática e agitada... 60	
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista científico, o gênero *Coffea* desperta grande interesse, devido à diversidade e complexidade química de seus constituintes. Estudos demonstram que as folhas, sementes e frutos dessas plantas contêm compostos bioativos como ligninas, terpenos, alcaloides (como a cafeína), melanoidinas, ácidos clorogênicos e diversos polifenóis. Esses compostos têm sido associados às propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e neuroprotetoras, reforçando a importância do café como fonte de moléculas de interesse farmacológico, nutracêutico e biotecnológico (Chen, 2019).

Espécies das plantas *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (conhecida como robusta) são amplamente cultivadas em diversos países tropicais e apresentam destaque no setor econômico. O café é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, sendo cultivado em mais de 70 países, principalmente Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia, como os maiores produtores respectivamente, responsáveis pela produção global da bebida, correspondendo a cerca de 70% da produção global (Peruzzolo, da Cruz e Ronqui, 2019). No Brasil, o café desempenha papel estratégico na economia, representado uma das principais *commodities* agrícolas de exportação e fonte de subsistência para milhões de produtores.

Para além do impacto econômico, o café ocupa um lugar central na cultura de diversas nações. Seu consumo diário, em diferentes formas e contextos sociais, está profundamente enraizado em hábitos culturais, celebrações, rituais familiares e práticas cotidianas (Garvin, 2021). Em países como Brasil, Itália, Colômbia, Etiópia e Japão, o ato de tomar café transcende o valor nutricional ou energético e se torna um elemento simbólico de sociabilidade, hospitalidade e identidade. Festivais do café, rotas turísticas e expressões artísticas relacionadas à bebida reforçam sua importância como patrimônio cultural imaterial.

A espécie *C. arabica* foi selecionada neste trabalho devido ao crescente interesse despertado nas últimas décadas e ao seu impacto econômico. Os fungos endofíticos associados à *C. arabica* apresentam uma diversidade particularmente atraente para a pesquisa biotecnológica nas áreas agrícola e farmacêutica, destacando-se de outras espécies de *Coffea* pela abundância de metabólitos bioativos e enzimas de interesse (Mourão *et al.*, 2025). Além disso, o recente interesse na microbiota da *C. arabica* aumentou, o que permite comparar e contextualizar os parâmetros e possibilitar o fornecimento de soluções sustentáveis para a agricultura, a medicina e a indústria (Asad *et al.*, 2023; Fu *et al.*, 2025).

Dentro desse universo microbiano, os fungos endofíticos se destacam como componentes ainda pouco explorados, embora fundamentais para a ecologia do cafeeiro. Microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro, mantêm uma relação mutualística com a planta, fornecendo benefícios como promoção do crescimento vegetal, indução de resistência a fatores de estresse abiótico (como seca, salinidade e temperatura) e biótico (como pragas e patógenos) (Cheng, 2022). Tais efeitos positivos estão relacionados à capacidade desses microrganismos em produzir metabólitos secundários bioativos, os quais desempenham funções ecológicas e apresentam potencial para aplicações nas áreas agrícola, médica e industrial.

A microbiota associada ao *Coffea arabica*, especialmente em regiões tropicais e subtropicais do Brasil, constitui uma fonte natural de microrganismos com capacidade de produzir substâncias de interesse biotecnológico (Ruta e Farcasanu, 2021; De Carvalho *et al.*, 2025). Dentre esses microrganismos, os fungos endofíticos vêm sendo amplamente estudados devido à sua habilidade de sintetizar enzimas extracelulares (como celulasas, lipases, amilases e proteases) e compostos antimicrobianos (Cheng, 2022). A bioprospecção desses fungos representa uma alternativa sustentável à utilização de substâncias sintéticas, especialmente diante do avanço da resistência antimicrobiana e da necessidade de soluções mais ecológicas nos diferentes setores produtivos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma triagem de fungos endofíticos isolados de plantas *Coffea arabica*, como produtores de biomoléculas, tanto enzimas como antimicrobianos de interesse biotecnológico para possíveis aplicações em agricultura, indústria e medicina.

## 1.2.. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados do café (*Coffea arabica*) para a produção de enzimas e de antimicrobianos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a. Obter, purificar e verificar a viabilidade de isolados endofíticos de folhas de *C. arabica*.
- b. Determinar a capacidade dos isolados em produzir enzimas extracelulares (lipase, celulase, amilase, pectinase e protease) em meio sólido.
- c. Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados e selecionar aqueles com maior potencial para cultivo em meio líquido.
- d. Cultivar o fungo com atividade antimicrobiana em meio líquido.
- e. Realizar extração líquido-líquido com acetato de etila do meio de cultivo para extração dos metabólitos extracelulares.
- f. Realizar extração do micélio fúngico com acetato de etila para obtenção dos metabólitos intracelulares.
- g. Realizar uma avaliação preliminar dos metabólitos presentes nos extratos orgânicos do fungo selecionado por CCD (Cromatografia em Camada Delgada).

## 2.3. 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Fungos Endofíticos

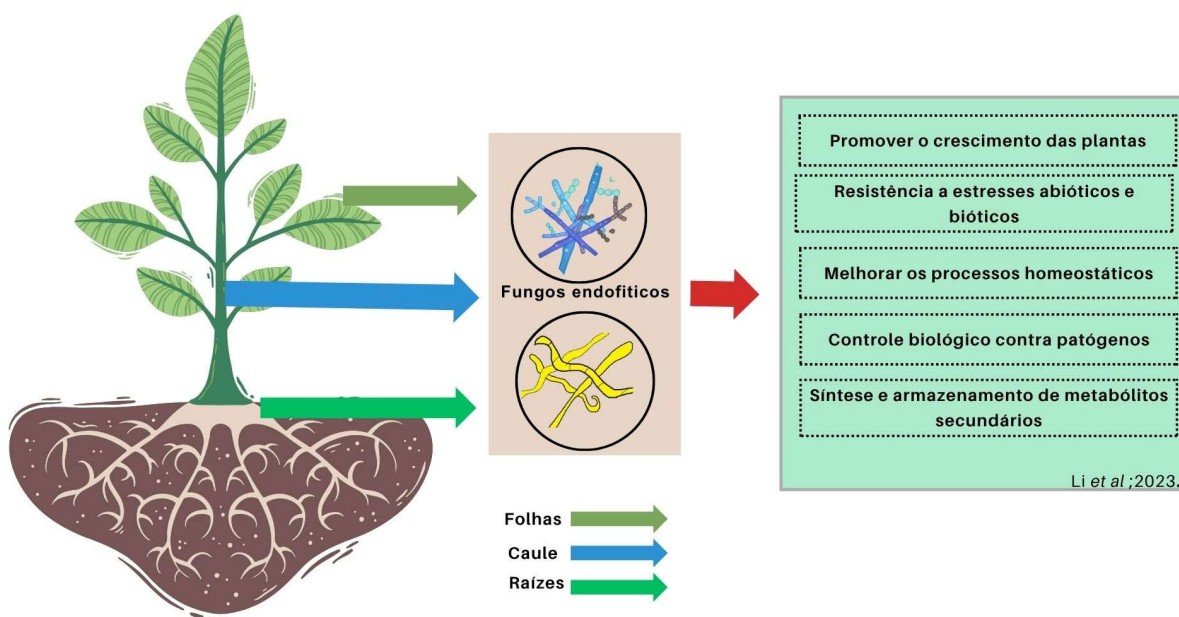
Os fungos são um grupo de microrganismos diversos, presentes em todos os ecossistemas, intervindo em diversos processos metabólicos que permitem o equilíbrio em diferentes sistemas vivos. Na vida humana podem participar de processos favoráveis ou prejudiciais. Dentre os processos favoráveis podem-se citar a fabricação de álcoois, aguardente, vinho, pão, glicerol, vitaminas, alcaloides, pigmentos, antimicrobianos, cervejas e uma variedade de enzimas. Alguns fungos filamentosos estão envolvidos na fabricação de ácidos orgânicos como o cítrico, glucônico, oxálico e láctico, produzidos por espécies como: *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus oryzae*; de vitaminas (*Aspergillus niger*), de antibióticos (*Penicillium chrysogenum*), de queijos (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*) e de enzimas (*Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp.), sendo importantes também na agricultura, no controle de pragas ou mesmo no desenvolvimento e crescimento das plantas. No entanto, podem participar de processos prejudiciais como no parasitismo em espécies vegetais, se comportando como fitopatógenos causando doenças nas plantas ou mesmo em animais e humanos causando micoses profundas ou superficiais (Esposito e Azevedo, 2004; Alder–Rangel *et al.*, 2020).

Ao se considerar o meio onde crescem, alguns fungos vivem dentro das plantas e são conhecidos como fungos endofíticos, sendo um tipo de fungo que vive no interior dos tecidos das plantas sem causar danos ao vegetal, podendo ser encontrados em uma ampla variedade de plantas, incluindo árvores, ervas e culturas agrícolas (Fontana *et al.*, 2021; De Andrade, 2024). Os microrganismos endofíticos, são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos semelhantes aos sintetizados pelas próprias plantas. Essa capacidade

biossintética permite a exploração desses compostos sem a necessidade de coleta intensiva ou destrutiva de espécies vegetais, especialmente aquelas ameaçadas de extinção ou de crescimento lento. Assim, os endófitos surgem como uma alternativa promissora na prospecção de novos fármacos, não apenas por sua diversidade metabólica e adaptabilidade, mas também por promoverem uma abordagem mais sustentável e ética (Cheng *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2022).

A relação que existe entre o endófito e sua planta hospedeira permite que o fungo endofítico seja capaz de produzir metabólitos bioativos, permitindo aumentar a sobrevivência de ambos os organismos (Esposito e Azevedo, 2004; Deshmukh *et al.*, 2018; Chen, 2019; Kharwar *et al.*, 2025). Embora alguns endófitos tenham um papel simbiótico, algumas espécies são consideradas oportunistas e aguardam a senescência da planta para aproveitar a colonização do tecido vegetal (Vicente *et al.*, 2021; Krachenko *et al.*, 2024). Por exemplo, quando uma planta nasce no local onde existia uma planta em decomposição, os fungos endofíticos dela podem colonizar a nova planta. Enquanto, um endófito mutualista proporciona à planta um potencial adaptativo diante de condições adversas de estresse, sejam elas abióticas (salinidade, acidez, seca e alta temperatura) ou bióticas (pragas e patógenos) (Solís-Perez *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024). A Figura 1 ilustra alguns dos benefícios gerados entre os endófitos e seus hospedeiros.

**Figura 1** - Interação entre plantas e microrganismos endofíticos.



Fonte: Do autor (2025). Figura adaptada de Servier Medical Art (<http://https://smart.servier.com/>) e Canva®.

A colonização pelos endófitos é realizada por produção de enzimas extracelulares que, juntamente com metabólitos secundários, podem degradar a parede celular da planta e neutralizar suas defesas químicas (Suryanarayanan *et al.*, 2012; Rajesh *et al.*; 2013; Zhang *et al.*, 2024). Diferentes enzimas, como as pectinases, xilanases, celulases, lipases e proteases foram descritas por serem responsáveis por esse processo (Mendes *et al.*, 2012; Sopalun *et al.*, 2020), tornando os fungos endofíticos uma fonte promissora de enzimas e metabólitos secundários. Além de suas funções ecológicas, essas enzimas são importantes em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico, de papel, entre outros. Enquanto os metabólitos especializados produzidos pelos endófitos podem estar relacionados ao sistema imunológico da planta, podendo protegê-la contra diferentes condições de estresse, como invasores patogênicos e escassez hídrica, além de, promover o desenvolvimento de seu hospedeiro. Em contrapartida, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários à sua sobrevivência, abrigo e a sua transferência às próximas gerações (Gomez e Luiz, 2018; Cruz *et al.*, 2025).

### 3.2. Relevância e características das espécies de *Coffea*

O gênero *Coffea* compreende diversas espécies, dentre as quais as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* se destacam por sua relevância econômica, sendo responsáveis pela produção dos cafés arábica e robusta, que representam aproximadamente 70% e 30%,

respectivamente, da produção mundial de café. O Brasil é o principal produtor e exportador mundial, seguido pelo Vietnã e pela Colômbia (Peruzzolo, da Cruz e Ronqui, 2019; Davis *et al.*, 2020; ABIC, 2021). Conforme indicado na Tabela 1, a qual apresenta os países maiores produtores de café e as espécies com maior representatividade na produção global. No caso de Brasil, respondendo por cerca de 36% dessa produção, sendo o estado de Minas Gerais (MG) o maior produtor nacional, responsável por mais de 40% do café brasileiro (Minas Gerais, 2023).

No cenário mineiro, o município de Alfenas, localizado no Sul de MG, é uma região de clima tropical de altitude, com estações chuvosa e seca bem definidas, e altitudes que variam entre 800 e 1000 metros acima do nível do mar – condições ideais para o cultivo de *C. arabica*. A colheita, realizada mecanicamente no período seco (entre junho e agosto), utiliza máquinas derriçadeiras que vibram os ramos dos cafeeiros, fazendo com que os frutos maduros caiam sobre coletores. Essa técnica permite uma alta eficiência operacional e é favorecida pelo relevo predominantemente plano e regular da região, típico dos cerrados mineiros.

**Tabela 1** - Produção mundial e principais países produtores de café.

<b>ASPECTO</b>	<b>DETALHE</b>
Grãos do gênero <i>Coffea</i>	- Café arábica e robusta são as espécies mais comercializadas.
Produção mundial	- Café arábica: 70% da produção mundial (OIC, 2024). - Café robusta: 30% da produção mundial (OIC, 2024).
<b>PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES (TONELADAS DE EXPORTAÇÃO)</b>	
1º. Brasil	- Maior produtor mundial. - Exporta aproximadamente 2,6 milhões de toneladas anuais (ABIC, 2021; OIC, 2024).

2°. Vietnã	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Segundo maior produtor, especializado em café robusta.</li> <li>- Exporta cerca de 1,65 milhão de toneladas anuais (OIC, 2024).</li> </ul>
3°. Colômbia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terceiro maior produtor, conhecido por seu café arábica de alta qualidade.</li> <li>- Exporta aproximadamente 840 mil toneladas anuais (FNNC, 2024)</li> </ul>
4°. Indonésia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quarto maior produtor, com uma mistura de café arábica e robusta.</li> <li>- Exporta cerca de 660 mil toneladas anuais (OIC, 2024)</li> </ul>
5°. Etiópia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quinto maior produtor e origem do café arábica.</li> <li>- Exporta aproximadamente 384 mil toneladas anuais (OIC, 2024)</li> </ul>

Fonte: ABIC (2021), OIC (2024) e FNNC (2024).

Entre as espécies de *Coffea*, observam-se diferenças agronômicas, genéticas e biológicas significativas. *C. arabica* é uma espécie predominantemente autógama (autofecundação), o que resulta em menor variabilidade genética em comparação com espécies alógamas, como *C. canephora*, que depende da polinização cruzada. No entanto, a autogamia de *C. arabica* proporciona maior estabilidade genética, o que é vantajoso para a manutenção de características desejáveis nas gerações seguintes, facilitando a seleção e a propagação de cultivares uniformes, especialmente em programas de melhoramento genético. O cultivo de *C. arabica* ocorre, predominantemente, em regiões montanhosas de clima tropical, situadas entre 600 e 2.000 metros acima do nível do mar. Essa espécie é mais sensível a condições adversas e a doenças, como a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), mas é altamente valorizada por apresentar atributos sensoriais superiores, como maior acidez e aroma refinado, sendo preferida no mercado de cafés especiais (Piotr *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2024). Por outro lado, *C. canephora* (café robusta) apresenta maior resistência a pragas, doenças e condições ambientais desfavoráveis, além de possuir maior teor de cafeína; entretanto, é considerada sensorialmente inferior, com sabor mais amargo e menos complexo, sendo geralmente utilizada em cafés solúveis ou blends (Díaz *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2024).

Os perfis de sabor distintos do arábica e do robusta são diretamente atribuídos à relação inversa em seus principais componentes químicos (Piotr *et al.*, 2020). O maior teor de açúcar e lipídios no arábica produz um café mais doce e complexo, com uma sensação mais rica na boca.

Em contraste, os altos níveis de cafeína e ácidos clorogênicos no robusta contribuem para seu amargor e adstringência pronunciados. Essa dicotomia química é o motor fundamental das preferências do consumidor e da segmentação de mercado.

### 3.3. Fungos endofíticos do café e seus metabólitos secundários

Os fungos endofíticos associados a *C. arabica* tem despertado crescente interesse científico devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários com potencial bioativo. No estudo de Fernandes *et al.* (2009), o extrato bruto do endófito *Alternaria alternata*, isolado de *C. arabica* apresentou atividade antimicrobiana, citotóxica e antioxidante. O extrato fúngico foi avaliado frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Além disso, os autores descreveram sua capacidade antioxidante como sendo moderada nas concentrações testadas. Quanto a análise citotóxica, o extrato apresentou atividade mediana contra algumas linhagens cancerígenas *in vitro*. Em razão disso, o extrato fúngico de *A. alternata* isolado do café configurou-se como uma importante fonte de metabólitos secundários, como uma possível alternativa para o desenvolvimento de agentes antitumorais, antioxidantes e antimicrobianos. Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de estudos voltados para a bioprospecção de fungos endofíticos isolados do café para posterior aplicação das substâncias por eles produzidas em diferentes áreas (Moraes, Ferraz e Chapla, 2020; Liu *et al.*, 2021).

A importância ecológica e funcional dos fungos endofíticos do café também foi evidenciada por Msenya *et al.* (2021), com um trabalho realizado no Quênia, no qual os autores descreveram o isolamento de fungos do fruto e do solo do café, e demonstraram que os fungos endofíticos são capazes de desempenhar um papel importante nos ecossistemas agroecológicos. Os pesquisadores isolaram e identificaram espécies de fungos endofíticos associados à cultura do café, os quais foram identificados e classificados de acordo com o seu potencial benéfico (decompositores de matéria orgânica ou de crescimento vegetal) ou potencial nocivo. Nos frutos foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Rhizopus* e *Colletotrichum*. Os autores também perceberam que o café utilizado nas explorações agrícolas tinha uma baixa prevalência de *Trichoderma* e o associaram a utilização de pesticidas e fungicidas. Determinaram que o

pequeno crescimento das plantações de café se devia à baixa atividade do fungo endofítico *Trichoderma* e de suas enzimas associadas.

No trabalho de Lu *et al.* (2022), um total de 235 cepas de fungos endofíticos foram isoladas e identificadas em plantações de café, na província de Yunnan, China. Os pesquisadores avaliaram a capacidade desses fungos endofíticos em inibir o crescimento de fungos e bactérias patogênicas. Foram estudadas 61 cepas contra dois fungos patogênicos (*Alternaria alternata* e *Penicillium digitatum*) e duas bactérias (*Pseudomonas syringae* e *Salmonella enterica enterica*). Este estudo demonstrou que vários fungos endofíticos apresentavam propriedades antifúngicas e antibacterianas, o fungo *Daldinia* ME-9 apresentou 74,7% de inibição do crescimento de *Penicillium digitatum*. Os resultados sugerem que os fungos endofíticos do café podem ser uma alternativa viável aos fungicidas e bactericidas químicos atualmente utilizados na agricultura (Lu *et al.*, 2022).

### 3.4. Enzimas e suas aplicações

As enzimas são biocatalisadoras naturais, que aceleram reações químicas sem serem consumidas no processo. Elas catalisam diferentes tipos de reações que ocorrem nos organismos e se apresentam em uma grande variedade, como é possível observar na Tabela 2. Desempenham papéis importantes em processos como a digestão de alimentos, a produção de energia, a síntese de moléculas complexas e a eliminação de resíduos (Nelson *et al.*, 2011).

Além de sua importância biológica, as enzimas têm ampla aplicação em setores como na indústria de alimentos, na agricultura, na produção farmacêutica, na biotecnologia ambiental e na produção de cosméticos. No setor alimentício, por exemplo, são utilizadas para melhorar a textura, o sabor e a conservação dos produtos; na indústria farmacêutica, são aplicadas na síntese de medicamentos e em métodos de diagnóstico clínico. A crescente demanda por processos sustentáveis e eficientes impulsionou o uso industrial dessas biomoléculas, graças a características como elevada especificidade, alta eficiência catalítica e capacidade de atuar em condições suaves, minimizando a formação de subprodutos indesejáveis (Souza *et al.*, 2018).

Estudos com fungos endofíticos isolados de diferentes partes do café indicaram seu potencial promissor na produção de enzimas capazes de degradar diferentes tipos de substâncias, e por essa razão, são destaques para aplicações em biotecnologia. Fungos das espécies *Induratia coffeana*, *Induratia yucatanensis* e *Induratia* sp. foram isoladas de *Coffea arabica* de cultivo orgânico na região de Viçosa-MG e se mostraram capazes de produzir

amilase, lipase, pectinase, celulase, fitase, protease, endo  $\beta$ -1,4 glucanase e exo  $\beta$ -1,4 glucanase (Monteiro *et al.*, 2020; Raghav *et al.*, 2022). Desta forma, os autores demonstram o potencial biotecnológico dos endófitos do café para obtenção de enzimas de interesse biológico e industrial.

**Tabela 2** - Quadro de classificação internacional de enzimas.

<b>Classe de enzima</b>	<b>Código</b>	<b>Tipo de reação</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Oxidoredutases</b>	<b>EC1</b>	Reações de óxido-redução	Desidrogenases, Oxidases
<b>Transferases</b>	<b>EC2</b>	Transferência de grupos funcionais	Aminotransferases, Fosfotransferases
<b>Hidrolases</b>	<b>EC3</b>	Hidrólise de ligações	Lipases, Proteases, celulase, amilase
<b>Liasas</b>	<b>EC4</b>	Ruptura de ligações sem hidrólise	Descarboxilases, Sintases
<b>Isomerases</b>	<b>EC5</b>	Interconversão de isômeros	Mutases, Epimerases
<b>Ligases</b>	<b>EC6</b>	União de duas moléculas	Sintetases, Carboxilases

Fonte: Nelson *et al.*, (2011).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C.3.1.1.3) constituem um dos grupos mais importantes e versáteis de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas, devido às inúmeras vantagens associadas ao seu uso. Essas enzimas podem ser produzidas em grande escala com alto rendimento a partir de microrganismos, o que favorece sua disponibilidade industrial. Catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (óleos e gorduras) em mono e diacilgliceróis e ácidos graxos em interfaces óleo/água, e, em sistemas não aquosos, também são capazes de promover reações como esterificação, transesterificação e interesterificação, resultando na formação de ésteres de alto valor agregado (Sena *et al.*, 2023).

Do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são preferidas devido à facilidade de produção em larga escala e recuperação do meio de fermentação. São amplamente utilizadas como aditivos alimentares, reagentes industriais, removedores de manchas, detergentes, agentes terapêuticos e em processos de biorremediação. Além disso, apresentam alta especificidade

catalítica, permitindo a obtenção de produtos que muitas vezes não são viáveis por rotas químicas tradicionais (Hasan *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2018; Temporiti *et al.*, 2022).

Nesse contexto, os fungos endofíticos representam fontes promissoras de lipases com potencial industrial. Esses microrganismos simbióticos, presentes nos tecidos de plantas como o cafeeiro (*Coffea arabica*), têm demonstrado capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, incluindo lipases, sob condições ecológicas e com diversidade funcional. Estudos com espécies como *Induratia coffeana* e *Induratia yucatanensis*, isoladas de cultivos orgânicos de café, evidenciaram sua aptidão para a biossíntese de lipases, entre outras enzimas, com aplicações em biocatálise. Essa capacidade reforça o papel estratégico dos endófitos na substituição de catalisadores químicos por alternativas enzimáticas mais sustentáveis, como demonstrado por Sabi *et al.*, 2025, que utilizaram lipases na produção de plastificantes ecológicos aplicados em filmes de PVC flexível. A bioprospecção e o desenvolvimento de processos fermentativos baseados nesses fungos podem ampliar significativamente o uso industrial de lipases, alinhando inovação biotecnológica e sustentabilidade.

As celulases pertencem à família das glicosilhidrolases (endo  $\beta$ , 1-4 glucanases (EC 3.2.1.4), exo  $\beta$ , 1-4 glucanases (EC 3.2.1.176) e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21)), e são enzimas biocatalisadoras que constituem um complexo de biomoléculas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo a sua hidrólise. Existem enzimas altamente específicas que atuam em sinergia para liberar açúcares, sendo a glicose uma substância que atrai grande interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro *et al.*, 2010; Linton, 2020; Liu *et al.*, 2021; Sutaoney *et al.*, 2024, Bhatia *et al.*, 2024).

Em meados da década de 80 iniciou-se a produção de celulases em escala industrial, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes (Floendo, 2022). Depois, passaram a ser utilizadas como insumo para a indústria de alimentos, para melhorar as propriedades sensoriais de massas. Também se mostravam importantes no processamento de bebidas, por conseguir clarificar sucos e vinhos (Linton, 2020). Essas enzimas passaram a ser utilizadas em larga escala em indústrias:

a) Têxtil, a celulose permite amaciar as peças de vestuário, eliminando as rugosidades através da degradação da microfibrila na superfície do tecido, ou seja, caem melhor e dobram-se mais facilmente; permitem a degomagem, eliminando o amido presente nas fibras após a fiação, o que permite a absorção de tinta pelo tecido, facilitando o tingimento (Korsa *et al.*, 2023); e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim).

b) Papel, as enzimas como facilitadoras da ação de lacases e peroxidases, ao degradarem a celulose presente na lignina, favorecem a sua remoção completa pelas enzimas lignolíticas. De acordo com Kmiotek, Dybka e Katmazyn (2021), essas enzimas contribuem para o refinamento das fibras de celulose, rompendo as ligações das microfibrilas, originando propriedades relacionadas ao tamanho, flexibilidade e resistência do papel.

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases. Apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, podem ser usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004; Babu *et al.*, 2022).

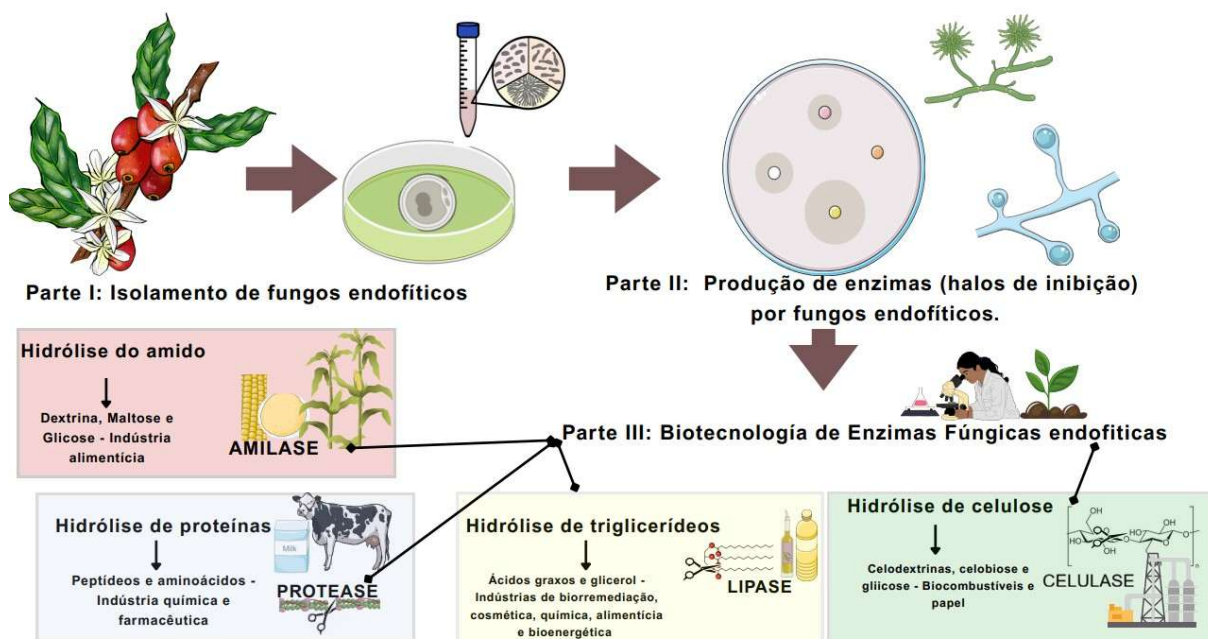
As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas. Elas são encontradas em diversos seres vivos e desempenham um papel vital em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo digestão, coagulação sanguínea e apoptose. As proteases de origem fúngica têm recebido maior atenção nos últimos anos devido à sua importância na área industrial e na área médica, alguns exemplos são as proteases do fungo *Rhizomucor miehei*, uma protease ácida que tem aplicações na fabricação de produtos lácteos, devido à sua capacidade de coagular em pH baixo (Dzurendova *et al.*, 2022). Na indústria têxtil também são usadas proteases de *Aspergillus niger*, ativadas em meio ácido, para utilização na indústria do couro, as quais degradam as proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos através da hidrólise das ligações peptídicas (Castrillón *et al.*, 2022; Martínez-Medina *et al.*, 2024).

As amilases são enzimas hidrolases (EC 3.2.1) que catalisam a quebra de ligações glicosídicas no amido. As amilases são classificadas, principalmente, em  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2) e glicoamilases (EC 3.2.1.3) (Ashok *et al.*, 2024). As  $\alpha$ -amilases quebram ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas aleatoriamente, dentro da cadeia de amido (endoatividade), gerando dextrinas, oligossacarídeos, glicose e maltose. Em contraste, as  $\beta$ -amilases atuam nas extremidades não redutoras (exoatividade), liberando unidades de maltose (Abedi, Shima e Seyed, 2024).

Cada tipo de amilase tem uma especificidade de clivagem diferente no amido, gerando produtos finais variados. Essa diversidade na especificidade de quebra de ligação é um fator-chave que determina sua aplicação na indústria. As amilases podem ter várias aplicações na indústria de alimentos e bebidas (panificação, fabricação de cerveja, produção de xarope, nutrição animal), desengomagem têxtil, formulação de detergentes e no crescente setor de biocombustíveis (Mondal *et al.*, 2022).

Os fungos endofíticos associados ao cafeeiro têm demonstrado potencial na produção de enzimas de interesse industrial, como amilases, proteases, lipases e celulases. Essas enzimas desempenham papéis importantes em diversos setores, incluindo o alimentício, farmacêutico, cosmético e de biocombustíveis, como citado anteriormente. A Figura 2 ilustra, de maneira simplificada, o processo desde o isolamento desses fungos até a aplicação biotecnológica de suas enzimas. A triagem de microrganismos busca justamente identificar cepas com potencial biotecnológico para aplicações em processos industriais, agrícolas e farmacêuticos. A utilização de fungos endofíticos como fontes de enzimas permite não apenas explorar uma biodiversidade pouco aproveitada, mas também contribuir para o desenvolvimento de bioprocessos mais sustentáveis, alinhando este trabalho com as demandas atuais por inovação e responsabilidade ambiental.

**Figura 2** – Enzimas de fungos endofíticos do Cafeeiro: Aplicações Biotecnológicas.



### 3. 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Material

Os fungos endofíticos utilizados nesse trabalho foram isolados em épocas diferentes: em 2022 pela discente de graduação Sophia dos Santos Silva e em 2025 pelo autor deste trabalho. Todos os fungos foram isolados de folhas saudáveis da espécie *Coffea arabica* L., os fungos de 2022 foram coletados em dois pontos da rodovia MG-179 no município de Alfenas-MG, uma das amostras da planta foi coletada na Latitude 21°28'03.7"S; Longitude 45°56'42.3"W, enquanto a outra amostra foi coletada na Latitude 21°27'57.3"S; Longitude 45°56'47.2"W. As duas amostras de planta foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Alfenas-MG sob tombo números 3242 e 3243, respectivamente. As amostras coletadas em 2025 foram coletadas no município de Campestre-MG na Latitude 21°43'14.0" S; Longitude 46°18'00.8" W. A planta está cadastrada no SisGen sob número A1F8CA1.

#### 4.2. Métodos

O processo de amostragem consistiu na seleção de folhas, livres de manchas e possíveis infecções externas. As amostras das plantas do primeiro local de coleta foram selecionadas e identificadas como pertencentes à planta 1, 2 e 3 do mesmo modo que as amostras do segundo local de coleta foram identificadas como pertencentes à planta 4 (Figura 3). Os fungos isolados foram purificados e preservados no Laboratório de Bioprocessos segundo a metodologia de Castellani (De Capriles, Mata e Middelveen; 1989).

Para garantir a rastreabilidade e organização dos isolados fúngicos obtidos a partir de *Coffea arabica*, foi adotado um sistema padronizado de codificação baseado na origem da amostra vegetal. Cada cepa foi identificada com um código composto por letras e números, como exemplificado em **CfP1F1X**, onde: "Cf" indica o gênero *Coffea*, "P1" refere-se à planta 1 da qual o fragmento foi coletado, "F1" representa a folha número 1 e "X" indica o fragmento específico da folha inoculado na placa de Petri. Esse sistema permitiu a distinção clara entre os diferentes pontos de coleta e fragmentos utilizados, além de facilitar a posterior análise das características morfológicas e enzimáticas dos isolados (Silva, 2024; Marin, Silva e Luiz, 2024).

**Figura 3** - Sistema de codificação dos isolados fúngicos endofíticos obtidos de *Coffea arabica*. Adaptado de Silva, 2024 e Marin, Silva e Luiz, 2024.



Fonte: Do autor (2025)

#### 4.2.1 Desinfestação das amostras vegetais para isolamento de endófitos

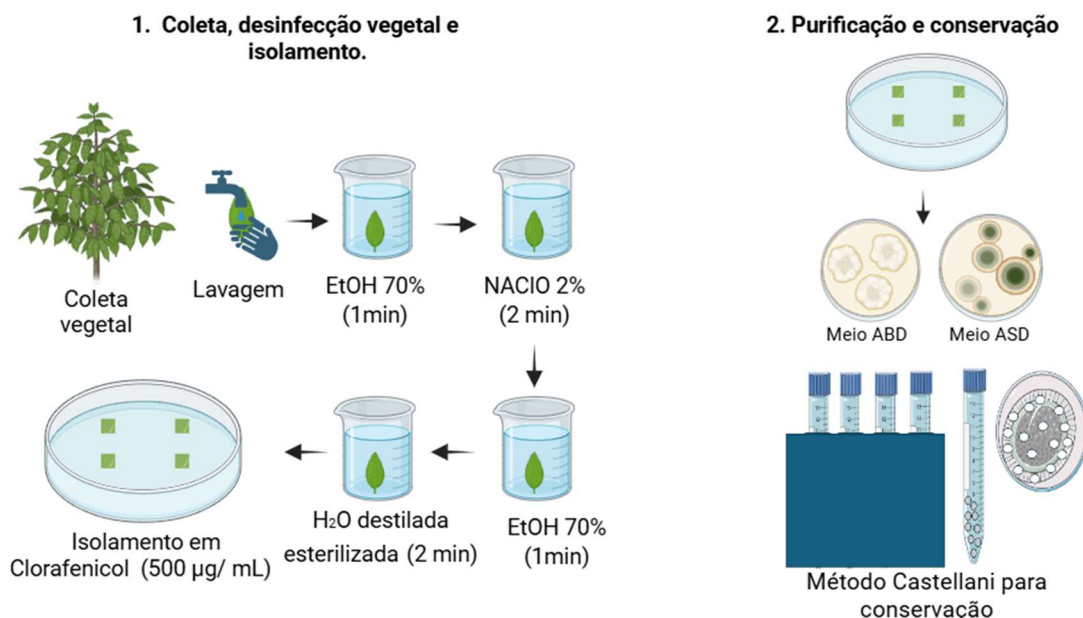
Todo o material botânico foi lavado superficialmente com sabão neutro e esponja e enxaguado em água corrente. A desinfestação das amostras foi realizada segundo a metodologia de Marcellano, Collanto e Fuentes (2017) com algumas modificações. As amostras de folhas previamente selecionadas foram submetidas à desinfestação em ambiente estéril, os fragmentos foram submersos em álcool 70% por 1 minuto; seguido de imersão em hipoclorito de sódio comercial 2% por 2 minutos, na sequência, as partes vegetais foram imersas em uma nova solução de álcool 70% por 1 minuto, sendo lavadas, finalmente, com água destilada esterilizada por 2 minutos (Figura 4). Utilizou-se a água esterilizada da lavagem final como controle de esterilidade a fim de avaliar a eficiência do processo de desinfestação, através da inoculação de água em placa de Petri contendo meio ágar-batata-dextrose (ABD) suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Silva, 2024).

A frequência de isolamento (FI) de fungos endofíticos foi determinada com base na proporção de fragmentos foliares que apresentaram crescimento fúngico após a incubação em meio de cultura. O cálculo foi realizado conforme descrito por Petrini (1986), utilizando a seguinte equação (EQ.1):

$$\text{EQ.1: } FI = \frac{\text{No. fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{No. total de fragmentos foliares}} \times 100$$

Este parâmetro foi utilizado para quantificar a incidência de fungos endofíticos em cada conjunto de amostras e comparar a eficiência do isolamento entre diferentes coletas.

**Figura 4** - Procedimento para isolamento de fungos endofíticos de *Coffea arabica*.



Fonte: Do autor (2025). Figura criada em Biorender.com

#### 4.2.2 Preservação e reativação dos fungos

Os fungos endofíticos isolados em 2022 por Silva (2024), bem como os fungos isolados em 2025 foram preservados em água estéril segundo a metodologia descrita por Castellani (De Capriles, Mata e Middelveen, 1989), posteriormente, foram reativados com o objetivo de avaliar sua viabilidade para continuidade dos estudos. Para isso, as amostras foram inoculadas em meio de cultura sólido, em placas de Petri contendo ágar-batata-dextrose (ABD) ou ágar Sabouraud dextrose (ASD), previamente esterilizados. As culturas foram incubadas em condições controladas, e o crescimento micelial de cada isolado foi monitorado diariamente por um período de até 12 dias, permitindo a seleção de cepas viáveis para as análises posteriores.

##### 4.2.2.1 Caracterização morfológica de dois fungos endofíticos

Para a caracterização morfológica, aplicou-se a técnica de fita adesiva combinada à coloração com azul de metileno. Após sete dias de crescimento dos fungos endofíticos em ABD, com uma tira de fita transparente foi pressionada contra a superfície da colônia, coletando

fragmentos de hifas e conídios. Em seguida, a fita foi montada sobre lâmina de vidro (lado adesivo voltado para baixo), recebeu azul de metileno a 0,1 % (cloreto de metiltionina), que possui natureza catiônica, permitindo interações com estruturas fúngicas que possuem carga negativa (Ramírez e Lozano, 2020), coberta com lamínula, permitindo a fixação e o contraste das estruturas celulares.

As lâminas foram observadas em microscópio com lentes objetivas 10×, 40× e 100×, nesta lente com imersão em óleo, e em seguida fotografadas. Este procedimento proporcionou visualização clara de septação e composição de conidióforos. Para as cepas mais promissoras — com atividade antimicrobiana positiva no estudo de triagem ou alto índice enzimático — realizou-se microcultivo em lâmina de vidro para descrição detalhada das estruturas reprodutivas *in situ*.

#### **4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio sólido apropriado e, após o crescimento desejado, fragmentos miceliais (com até 2mm de largura e até 3mm de altura) foram cuidadosamente retirados da superfície do meio de cultura. Imediatamente após a coleta, os fragmentos foram imersos em solução fixadora de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2), sendo mantidos a 4°C por 24 horas (Staniszewska et al., 2013)

Após a etapa de fixação, os fragmentos miceliais foram lavados três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,05M (10 minutos cada lavagem) e submetidos à desidratação progressiva em série de soluções de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), com intervalos de 10 minutos para cada concentração, realizando três lavagens na acetona 100%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem pelo ponto crítico (Torres *et al.*, 2016; Venkatesh *et al.*, 2018)

Os fragmentos desidratados foram montados em *stubs* de alumínio utilizando fita dupla face de carbono e metalizados por evaporação de ouro. A análise morfológica foi então realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura TESCAN MIRA 4LMU, técnica MEV-FEG no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Alenas (CEMIC) com captura de imagens em ultra-alta resolução para a avaliação detalhada da microestrutura micelial e estruturas fúngicas presentes.

### 4.2.3. Avaliação das atividades enzimáticas

Para a avaliação do potencial enzimático dos fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica*, os isolados previamente repicados foram inoculados em meios de cultura específicos para detecção das enzimas celulase, protease, amilase e lipase. Os meios foram preparados com os respectivos substratos: carboximetilcelulose para celulase, leite bovino desnatado para protease, amido para amilase e, no caso da lipase, foram utilizados diferentes dois substratos: Tween® 20 e Tween® 80. Todos os meios foram autoclavados a uma temperatura entre 120 e 125 °C, por 30 minutos, para garantir a esterilidade do meio. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por sete dias, sendo observada a formação de halos de hidrólise ao redor das colônias como indicativo da atividade enzimática. A presença de halos claros nas regiões de difusão do substrato foi interpretada como evidência da secreção de enzimas extracelulares pelos isolados avaliados, permitindo inferir o seu potencial biotecnológico.

#### 4.2.3.1 Atividade amilolítica (amilase)

O ensaio de degradação amilolítica em fungos endofíticos foi conduzido segundo Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações, pela inoculação de cada isolado em meio sólido à base de ágar-batata suplementado com amido solúvel a 2% (p/v), ajustado para pH 5,0, e incubado a  $28 \pm 2$  °C por sete dias. A atividade enzimática foi detectada pela adição de solução de Lugol (0,026% de iodo molecular e 0,26% de iodeto de potássio), que forma o complexo triiodeto ( $I_3^-$ ) responsável pela coloração azul-escura característica na presença de amiloseamilase. Na ocorrência de amilases extracelulares, as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de glicose são hidrolisadas, gerando oligossacarídeos como maltose e glicose, o que impede a formação do complexo com o iodo e resulta em halos claros ou zonas incolores ao redor das colônias (Ire *et al.*, 2020). Assim, a reação positiva foi caracterizada pela presença de halos de degradação contrastando com as regiões azul-escuras de amido intacto, sendo o diâmetro desses halos considerado um parâmetro qualitativo da intensidade enzimática.

#### 4.2.3.2 Atividade celulolítica (celulase)

As placas foram incubadas em câmara de crescimento a  $28 \pm 2$  °C por 6 dias, devido ao rápido crescimento dos fungos endofíticos isolados. Após a incubação, 10 mL de solução de

iodo  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , foram adicionados em cada placa e deixados agir por 15 segundos em temperatura ambiente. Foram observadas as zonas de hidrólise ao redor das colônias, a presença do halo foi considerada evidência positiva para atividade celulolítica.

O teste de degradação da celulose foi realizado pela inoculação do microrganismo em meio sólido com ágar suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono a 1% (p/v) e extrato de levedura a 0,5% (p/v), com a seguinte composição em  $\text{g.L}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $65 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $15 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) composto pela solução estoque e pelo meio mínimo M9 (Solução estoque  $0,2 \text{ L}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $1\text{M}$   $0,02 \text{ L}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$   $10 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $1\text{M}$   $0,01 \text{ L}$ , ágar bacteriológico  $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) com pH entre 7 e 7,2 (Teather e Wood., 1982; Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). As placas foram incubadas a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 dias. Após o período de incubação, a atividade enzimática foi detectada pela adição de  $10 \text{ mL}$  de solução de iodo  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ( $\text{I}_2/\text{KI}$ ), que reage com polissacarídeos não hidrolisados, como a  $\beta$ -glucana entre resíduos de glicose. Após a adição do reagente de iodo, as regiões com CMC intacta formam um complexo de cor castanho-escuro a marrom-avermelhado, enquanto as zonas onde ocorreu a hidrólise enzimática aparecem como halos claros ou incolores ao redor das colônias, constituindo uma reação positiva para atividade celulolítica.

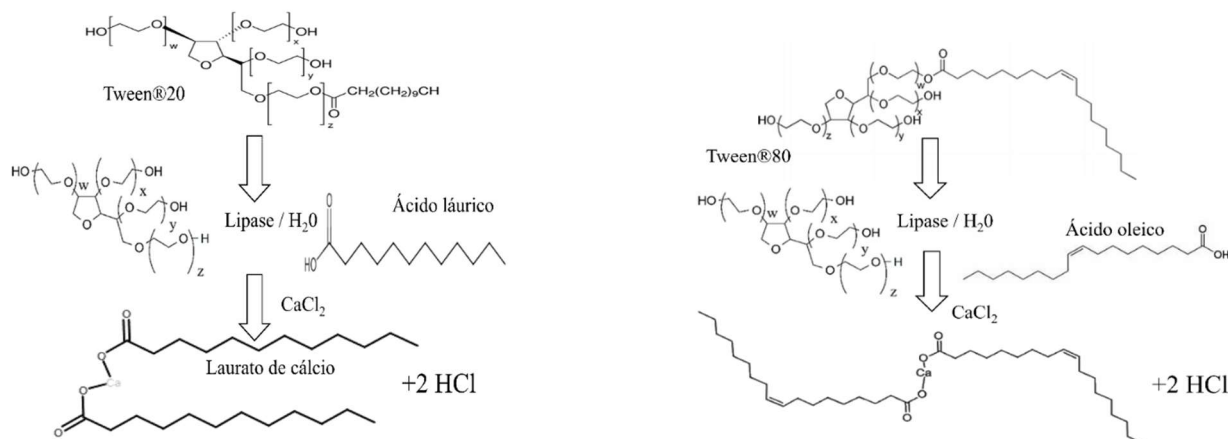
#### 4.2.3.3 Atividade lipolítica (lipase) e esterase.

A metodologia para determinar a atividade lipolítica em fungos endofíticos está em conformidade com a metodologia de Dabaja *et al.* (2019). Para avaliar a atividade lipolítica, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura composto por:  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar,  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ),  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona e  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). No momento do plaqueamento diluiu-se Tween® 20 ou Tween® 80 na proporção de 1% (v/v) com um pH entre 7,0 - 7,4. A leitura dos halos foi feita após no máximo 7 dias. Para permitir a visualização clara do halo e o cálculo subsequente do índice enzimático, as culturas que apresentaram crescimento acelerado antes do dia 7 foram transferidas para refrigeração ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para retardar seu crescimento.

O polissorbato é um monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano (Tween® 20) e monooleato de polioxietileno(20)sorbitano (Tween® 80), composto por uma ligação éster entre um ácido graxo e um álcool (Figura 5). No meio de cultura, atua como fonte de lipídio, sendo necessária a produção de lipases para sua degradação. A clivagem da ligação éster pelas lipases extracelulares libera ácido láurico, que, ao reagir com o  $\text{CaCl}_2$  presente no meio, forma laurato

de cálcio para Tween® 20 e oleato de cálcio para 80 — um sal insolúvel que precipita em forma de cristais visíveis, caracterizando halo de precipitação e indicando atividade lipolítica positiva (Pohanka, 2019).

**Figura 5** - Representação esquemática da hidrólise enzimática dos surfactantes Tween® 20 (A) Tween® 80 (B) por lipases e formação dos respectivos sais de cálcio.



Do autor (2025). Chemspider®

#### 4.2.3.4 Atividade pectinolítica (pectinase).

O teste de degradação pectinolítica será foi conduzido pela inoculação dos microrganismos fúngicos em meio sólido contendo ágar suplementado com pectina cítrica solúvel a 1%, o pH do meio será foi modificado para duas diferentes pectinases, pH 5,0 para a caracterização de poligalacturonase e o pH 8,0 para pectato liase (Hankin e Anagnostakis, 1975). As placas Petri deverão serforam incubadas a 28 °C por sete dias. Após esse período, a detecção da atividade enzimática (Figura 6), será foi obtida utilizando uma solução de lugol, que deveráque foi ser preparada com 0,026% de iodo molecular (I<sub>2</sub>) e 0,26% de iodeto de potássio (KI), permitindo a formação do complexo I<sub>3</sub><sup>-</sup> (Pesek e Silaghi-Dumitrescu, 2024). A atividade pectinolítica será foi identificada pela presença de halos incolores ao redor das colônias.

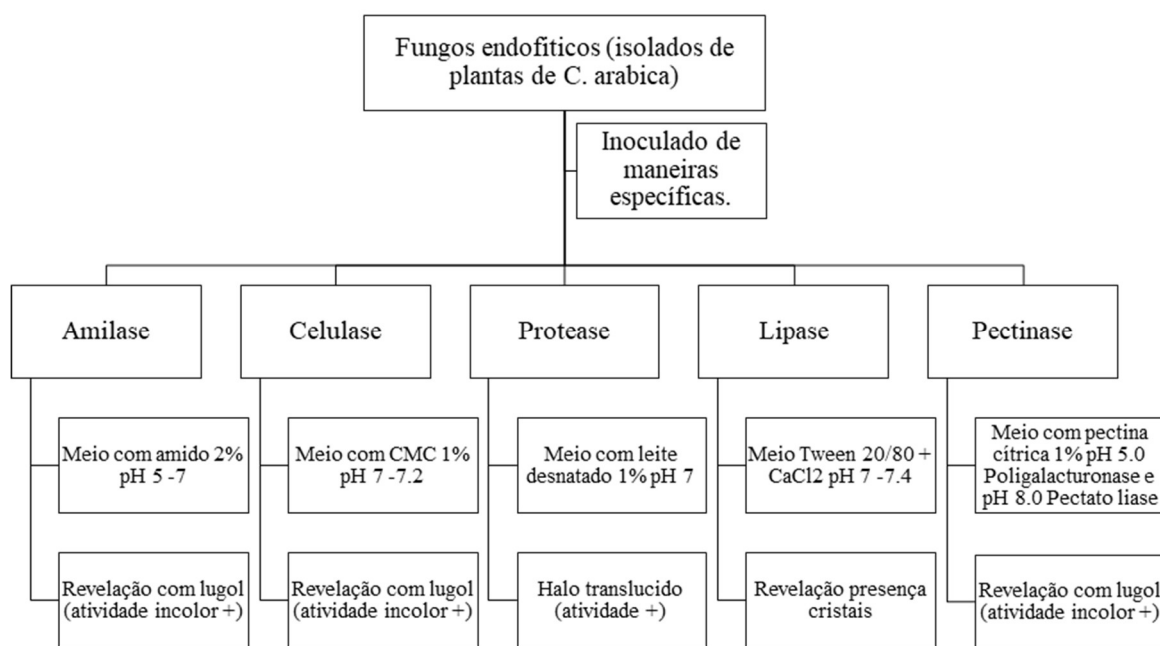
#### 4.2.3.5 Atividade proteolítica (protease).

O ensaio de atividade proteolítica foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por Monteiro et al, (2020) com modificações. Os isolados fúngicos foram inoculados em meio sólido específico para protease, com a seguinte composição (em g.L<sup>-1</sup>): leite desnatado (10,0), extrato de levedura (1,0), KNO<sub>3</sub> (3,0), NaCl (2,0), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,0), MgSO<sub>4</sub> (0,05), CaCl<sub>2</sub> (0,02), ágar (20,0), pH final ajustado para 7,0 (Figura 6)..

O princípio do ensaio baseia-se na ação de proteinases e peptidases extracelulares secretadas pelos fungos. O leite desnatado atua como substrato proteico, sendo sua opacidade característica conferida pela caseína, a principal proteína do leite, que forma micelas em suspensão que dispersam a luz. A hidrólise enzimática das ligações peptídicas da caseína por essas enzimas resulta na produção de peptídeos solúveis e aminoácidos de baixo peso molecular (Maitig *et al.*, 2018). Estes produtos de degradação são transparentes e não dispersam a luz, levando à formação de uma zona clara e translúcida (halo de degradação) ao redor das colônias com atividade positiva, em contraste com o meio intacto que permanece opaco. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por um período de até sete dias e monitoradas periodicamente para observação da formação dos halos.

O conjunto dessas análises enzimáticas permitiu identificar, de forma preliminar e qualitativa, os isolados de fungos endofíticos com maior capacidade de produção de enzimas extracelulares. A diversidade de substratos e os métodos de revelação empregados assegura uma avaliação abrangente das principais classes de hidrolases de interesse biotecnológico. Os resultados obtidos nesta etapa são fundamentais para a seleção de cepas promissoras para serem cultivadas em meio líquido e posteriormente avaliadas quanto ao rendimento e estabilidade das enzimas produzidas.

**Figura 6** - Fluxograma com as avaliações enzimáticas de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica*.



Fonte: Do autor (2025).

#### 4.2.4 Determinação do índice enzimático (IE).

A determinação enzimática foi representada através do cálculo do índice enzimático (IE), que relaciona o diâmetro médio do halo de inibição com o diâmetro médio da colônia (EQ.2). Para que a produção de enzimas por fungos seja considerada válida o valor de IE deve ser maior ou igual a 2,00, de modo que assim os isolados que apresentarem com maiores valores de índice enzimático serão interpretados como sendo dotados de maior atividade enzimática extracelular (Dabaja *et al.*, 2019).

$$\text{EQ.2:} \quad IE = \frac{\text{Diâmetro do halo de inibição}}{\text{Diâmetro da colônia fúngica}}$$

#### 4.2.5 Triagem antimicrobiana: Método do ágar em bloco.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados do café foi realizada pelo método do ágar em bloco, como uma triagem prévia para verificar o potencial de produção de antimicrobianos por esses endófitos. Fragmentos de 5,0 mm das colônias fúngicas foram inoculadas em meio sólido contendo o patógeno a ser confrontado. Foram avaliados os seguintes patógenos: *Candida albicans* (ATCC 09548), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) bactéria Gram-positiva e *Escherichia coli* (ATCC 25922) bactéria Gram-negativa. As amostras de bactérias foram estocadas em meio ágar BHI (Brain Heart Infusion) + 2 % de ágar nutritivo;

e da levedura, em meio ágar Sabouraud, a  $28 \pm 2$  °C, até o momento de realização dos testes. Preparadas previamente em solução salina estéril 75%, cuja transmitância a 660 nm corresponde a uma absorvância de 1,5, equivalente a  $3 \times 10^8$  UFC/mL realizados em duplicata.

Devido à observação de diferenças morfológicas evidentes entre os isolados fúngicos, especialmente no crescimento em meio de cultura, e à ausência de identificação taxonômica precisa, as amostras foram consideradas como unidades independentes. Essa heterogeneidade inviabiliza a aplicação de testes estatísticos inferenciais comparativos, que exigem grupos experimentais homogêneos. Diante disso, optou-se por uma abordagem descritiva, com análise exploratória dos dados obtidos nos ensaios.

#### **4.2.6 Co-cultivo aplicado a fungos endofíticos.**

Foram realizados ensaios de co-cultivo entre os fungos endofíticos que apresentaram maiores halos de inibição na atividade antimicrobiana nos ensaios do ágar em bloco. Os fungos endofíticos foram cultivados individualmente em placas Petri, em meio ABD, durante 7 dias a  $28 \pm 2$ °C. Fragmentos de 5mm de diâmetro de duas colônias diferentes foram recortados e inoculados em cada placa, os quais foram monitorados diariamente até que os micélios de ambos crescessem. A interação entre as linhagens fúngicas foi observada macroscopicamente na região de confronto entre as espécies.

#### **4.3 Cultivo de fungo endofítico em meio líquido Czapek.**

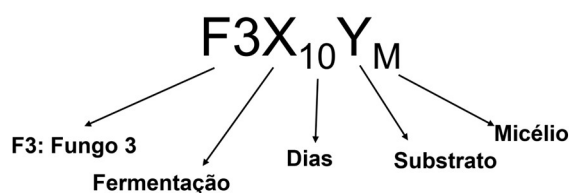
O cultivo em meio líquido foi realizado em caldo Czapek (Glicose: 30,0 g; NaNO<sub>3</sub>: 2,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; KCl: 0,5 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: 1 L). Seis discos de 5 mm de ágar contendo o micélio foram inoculados em erlenmeyers de 1 L, cada um com 0,2 L de meio, totalizando 0,4 L para cada experimento. As fermentações preliminares foram conduzidas em duas categorias: (i) modo estático, em estufa DBO a 28 °C por até 20 dias. O caldo foi avaliado após 10, 15 e 20 dias de cultivo do fungo. Foram utilizadas duas condições: meio Czapek sem nitrato de sódio, exceto no dia 15, quando foi incluída uma duplicata preparada com NaNO<sub>3</sub>, permitindo comparar a influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento micelial e a produção de metabólitos; (ii) modo agitado, em shaker a 28 °C a 200 rpm por 15 dias. Com retiradas do caldo para análise com 5, 10 e 15 dias de cultivo todos em meio Czapek. Essa condição buscou simular um ambiente aeróbico

controlado, favorecendo maior transferência de oxigênio e homogeneidade no meio, permitindo avaliar a influência da agitação sobre a biomassa, os extratos e a atividade biológica em relação ao cultivo estático. Em ambas as condições, dois erlenmeyers foram processados em determinado dia de cultivo, para determinação da biomassa, obtenção do extrato orgânico e ensaios de atividade biológica.

#### 4.3.1 Obtenção de extratos orgânicos secos.

Após o cultivo do fungo endofítico selecionado, o caldo de fermentação foi filtrado a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1, para separação do micélio. O filtrado resultante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila, realizada em três etapas sucessivas, com proporção final 1:1 ( $V_{\text{caldo fermentado}}/V_{\text{solvente}}$ ). O solvente foi removido em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato orgânico seco, cuja massa foi determinada em balança analítica, cada extrato recebeu um código de acordo com a Figura 7. O extrato obtido foi avaliado quanto ao rendimento de biomassa. Seu potencial antimicrobiano e antioxidante será avaliado, buscando estabelecer a relação entre as condições de cultivo (estático vs. agitado; presença ou ausência de nitrato de sódio) e a produção de metabólitos bioativos.

**Figura 7** - Sistema de codificação dos extratos obtidos do fungo CfP1F3A.



Fonte: Do autor (2025). A letra X indica o tipo de fermentação (E para estática, A para agitada) e a letra Y indica a presença (N) ou ausência (S) de fonte de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ) no substrato.

#### 4.4 Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Os extratos obtidos a partir das extrações líquido-líquido foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (20 × 20 cm) como fase estacionária, e uma mistura de solventes (fase móvel) apropriados para eluir os compostos presentes nos extratos. Os extratos foram preparados nas concentrações de 5-10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , aplicados na CCD (cerca de 2  $\mu\text{L}$ ), que foram eluídos com acetato de

etila:hexano:metanol na proporção (7:2:1; v:v:v). Após a eluição as placas de CCD foram reveladas sob luz ultravioleta em 254 e 365 nm, para visualização dos perfis cromatográficos. Foram utilizados também reveladores químicos como cloreto férrico, anisalaldeído, ninhidrina, ácido fosfomolibdico e reagente de Dragendorff (Zarzycki. 2008)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento e caracterização morfológica preliminar dos fungos endofíticos.

Um total de 80 fragmentos foliares de *Coffea arabica* foram inoculados em meio de cultura de ABD com clorafenicol, obtidos de coletas realizadas em dois períodos distintos: 2022 e 2025. Na primeira coleta, realizada em 2022, foram inoculados 52 fragmentos, dos quais 27 apresentaram crescimento fúngico, resultando em uma frequência de isolamento de 51,9%. Já na coleta realizada em 2025, foram inoculados 28 fragmentos, com obtenção de 18 isolados, correspondendo a uma frequência de isolamento de 64,3% (Tabela 3).

Após o isolamento, os microrganismos foram preservados e, posteriormente, reativados para os ensaios biológicos. Durante esse processo, observou-se a perda de viabilidade de sete isolados: um da coleta de 2022 com código CfP1F3A2 (No. 5) e seis da coleta de 2025 com código CfP4F3A2, CfP4F1B2, CfP4F2A1, CfP4F2A3, CfP4F2A4 e CfP4F2B2, totalizando sete perdas (15,55%) sobre os 45 fungos inicialmente isolados.

**Tabela 3-** Frequência de isolamento de fungos endofíticos por fragmento foliar 2022 – 2025.

Ano da coleta	Nº de fragmentos inoculados	Nº de isolados obtidos	Frequência de isolamento (%)	Isolados inviáveis após reativação
2022	52	27	51,9%	1
2025	28	18	64,3%	6
<b>Total</b>	80	45	56,3%	7*

\* Representa os fungos endofíticos não viáveis, após o processo de isolamento.

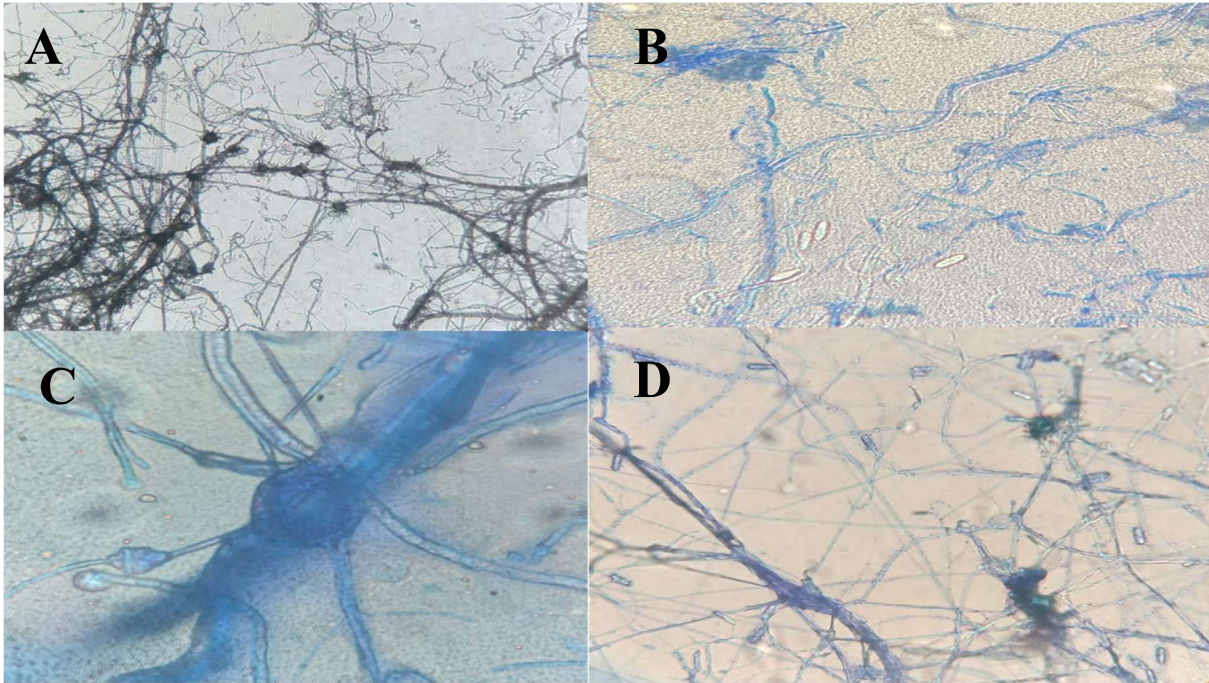
Fonte: Do autor (2025).

Durante a fase de reativação dos isolados preservados, observou-se que os fungos codificados como CfP3F1A1 e CfP4F4A1 apresentaram crescimento micelial muito reduzido em meio ágar batata dextrose (ABD). Para viabilizar a recuperação e posterior triagem enzimática desses isolados, foi necessário transferi-los para meio ágar Sabouraud (ASD), onde apresentaram melhor desenvolvimento. Essa adaptação de meio foi adotada apenas para esses dois casos específicos, mantendo-se o uso de ABD para os demais isolados. De forma complementar, os isolados que perderam a viabilidade também, foram transferidos para ASD com o objetivo de estimular o crescimento micelial, mas não apresentaram recuperação, confirmando a perda total de viabilidade.

### **5.1.1 Caracterização morfológica dos fungos.**

A análise morfológica dos fungos endofíticos pela técnica da fita adesiva (Figura 8) revelou diferentes padrões de hifas (A, C) e a presença de conídios (B, D). No isolado CfP4F3B2, foram identificadas estruturas típicas para identificação, como hifas septadas, conidióforos e conídios em vários estágios, permitindo uma distinção preliminar entre os isolados.

**Figura 8** - Observações microscópicas de micélio e estruturas conidiais em isolados de fungos endofíticos

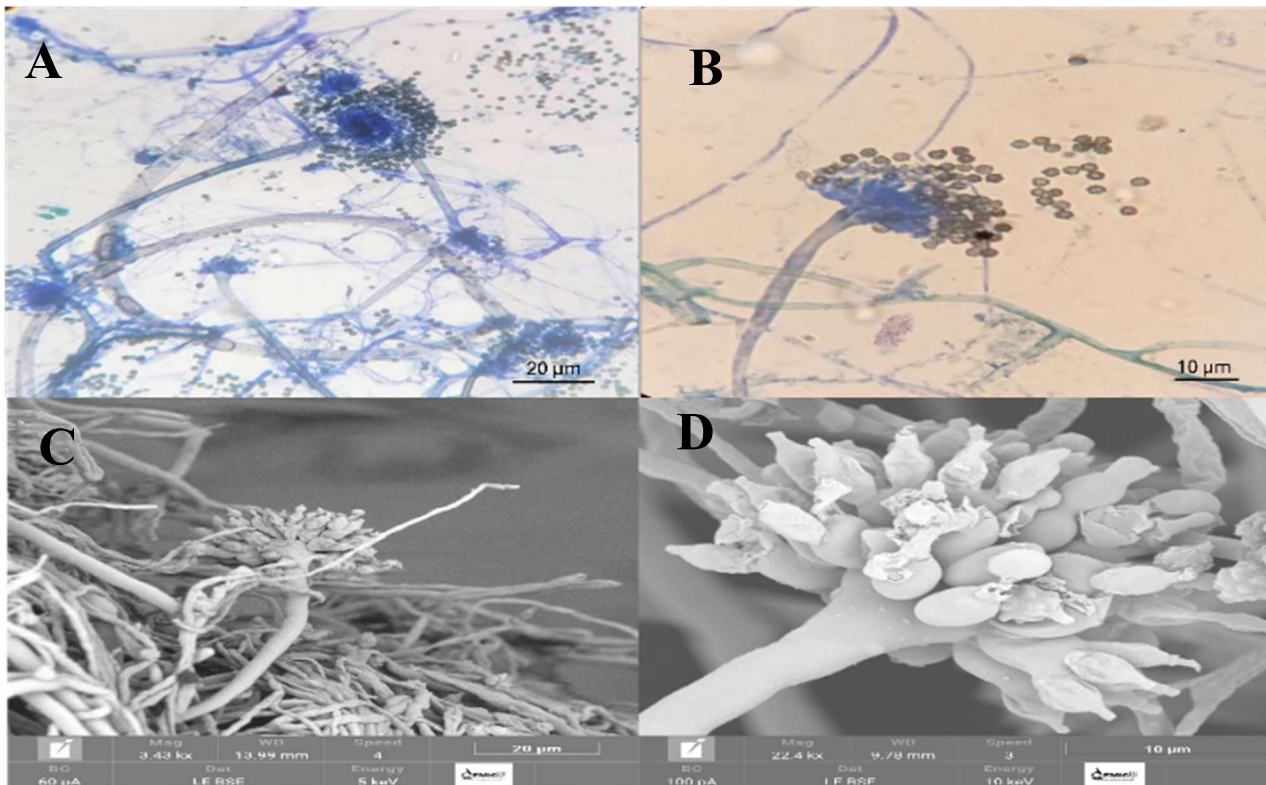


Fonte: Do autor (2025).

Legenda: (A) (CfP3F1C1) e (C) (CfP1F3A) Hifas septadas. (B) (CfP3F2B2) e (D) (CfP3F1D2) Estruturas conidiais.

Embora a maioria dos fungos não tenha apresentado estruturas suficientemente distintas para permitir a identificação até o nível de gênero, foi possível reconhecer, com base na morfologia típica dos conidióforos e da organização das cabeças conidiais, que o isolado CfP3F1A1 pertence ao gênero *Aspergillus*, cujas estruturas observadas correspondem à forma assexuada de reprodução típica do gênero como se observa na Figura 9, apresentando conidióforos eretos com vesícula apical globosa, sobre a qual se dispõem fiáldes que produzem conídios em cadeias concêntricas (Petit *et al.*, 2025; Teresia *et al.*, 2020).

**Figura 9** - Morfologia da estrutura do fungo endofítico CfP3F1A1.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: (A) Conidióforos, Microscópio óptico 40X. (B) Vesícula apical fúngica. (C) Microscopia eletrônica de varredura (MEV), micélio e esporângio. (D) MEV, vesícula apical coberta por métulas e fiálides.

Por outro lado, como as amostras apresentam hifas filamentosas septadas, a ausência de hifas septadas permite a exclusão do filo Zygomycota (Gupta e Tuohy, 2022). Em alguns casos, observou-se fragmentação artrospórica (fragmentação de hifas em artrosporos), mas nenhuma outra estrutura especializada foi observada que permitisse a identificação de outro gênero de fungo. Como os fungos CfP3F2B2 (Figura 8B), CfP3F2B, CfP3F1D2 (Figura 8D), CfP3F1C1 (Figura 8A), CfP3F1A1, CfP1F3A1 (*Aspergillus*, Figura 9), CfP1F3A (Figura 8C), CfP4F2B1, CfP4F4A1 e CfP3F1C2 cujos filamentos apresentaram paredes transversais (septos) e ramificação dicotômica, formando um micélio bem desenvolvido sendo típico de fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota (Senanayake *et al.*, 2020; Gupta e Tuohy., 2022).

Contudo, os isolados avaliados, 23 de 43, não apresentam estruturas suficientes para permitir uma distinção segura entre Ascomycota e Basidiomycota, visto que a presença de hifas septadas é uma característica comum a ambos os filos. Dessa forma, na ausência de evidências morfológicas reprodutivas típicas, como basidiósporos, fiálides, esterigmas, ascos ou estruturas conidiais específicas, não permitiu a classificação desses isolados, portanto, permanecem

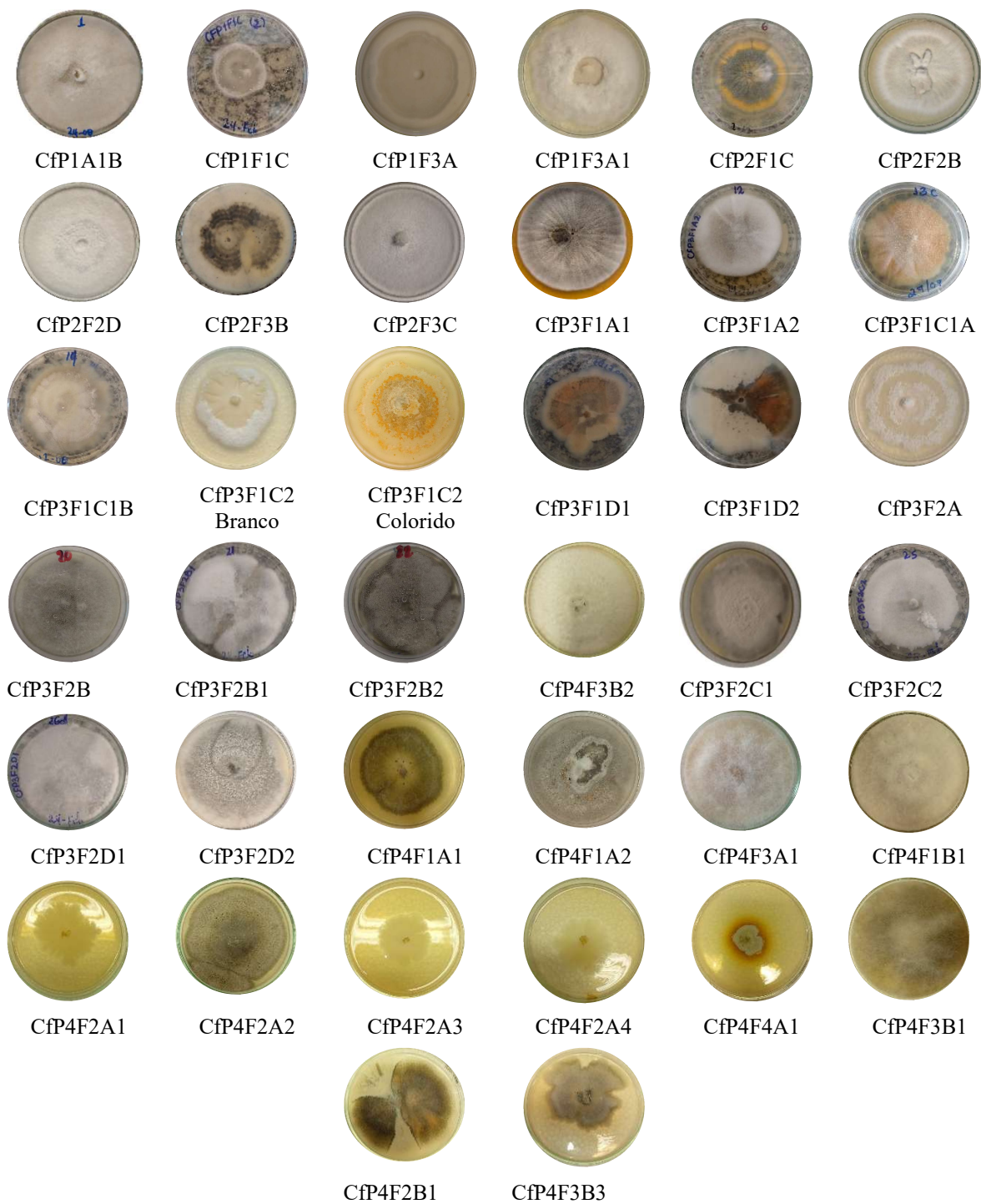
descritos como fungos filamentosos septados de filo indeterminado, excluindo apenas Zygomycota.

## 5.2. Diversidade de pigmentos em fungos endofíticos isolados de café.

Os fungos endofíticos isolados neste estudo apresentaram uma diversidade notável na produção de pigmentos. De acordo com o observado na Figura 10, 23 fungos apresentaram pigmentação, portanto, cerca de 53,5% dos isolados exibiram produção visível de pigmentos, incluindo colorações verdes CfP2F1C, CfP4F1A1, CfP4F1B1 e CfP4F3B1, alaranjadas como no caso de CfP2F1C e CfP3F1C2, e de ocre a marrons CfP3F1D1, CfP3F1D2, CfP3F2B2 e CfP4F2A2, típico de compostos como as melaninas (Suthar, Dufossé e Sigh., 2023). Essa variabilidade na pigmentação também reforça seu potencial biotecnológico.

Essa capacidade metabólica é respaldada por estudos recentes que destacam a relevância industrial dos pigmentos fúngicos. Bagy *et al.* (2023), demonstraram que fungos ectófitos (epífitos) como *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus flavus* e *Epicoccum nigrum* são capazes de produzir pigmentos naturais nas cores vermelha, laranja e amarela em meio líquido, com potencial aplicação como corantes alimentares ecológicos, representando uma alternativa segura aos corantes sintéticos, frequentemente associados a efeitos tóxicos (Barciela, Perez-Vazquez e Prieto, 2023).

No trabalho de El-Sayed *et al.* (2022), os autores isolaram o fungo endofítico *Monascus ruber* SRZ112 de folhas de *Origanum majorana*, o qual produziu pigmentos vermelhos do grupo das azafilonas, como a rubropunctamina, monascina e ankaflavina, em fermentação em estado sólido. De forma semelhante, o trabalho de Mishra *et al.* (2021), reportou a caracterização da cepa endofítica *Talaromyces assiutensis*, isolada de raízes do manguê *Avicennia marina*, como produtora de pigmento vermelho extracelular com propriedades antimicrobianas ressaltando o valor farmacológico associado à pigmentação.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: Os fungos endofíticos CfP3F3C, CfP4F3A2, CfP4F1B2 e CfP4F2B2 não possuem registro fotográfico, pois as culturas não sobreviveram após o processo de reativação.

No contexto amazônico, Pereira *et al.* (2024), identificaram fungos endofíticos pigmentogênicos isolados da planta medicinal *Fridericia chica*, cujos pigmentos extracelulares

apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana significativa, demonstrando que endófitos associados às plantas ricas em metabólitos secundários podem ser fontes promissoras de interesses industriais e farmacêuticos.

Neste trabalho, 13 dos 43 fungos endofíticos (30,2%), apresentaram coloração marrom nas colônias, especialmente no lado inferior da placa (verso), o que pode indicar possível produção de melanina. Suthar *et al.* (2023) pesquisou o papel da melanina fúngica e determinou que a melanina é uma substância de alto peso molecular em comparação com outros pigmentos fúngicos, é e frequentemente, é produzida como metabólito secundário em resposta aos estresses ambientais. Dentre suas funções podem-se citar a proteção contra radiação UV, agentes oxidativos, temperaturas extremas e metais pesados, além de aumentar a resistência celular e atuar como antioxidante e antimicrobiano natural. A melanina também tem sido explorada por sua aplicabilidade em cosméticos, biomateriais, eletrônica, farmacologia e embalagens biodegradáveis, configurando-se como um dos pigmentos fúngicos mais promissores no cenário da biotecnologia.

### **5.3. Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados fúngicos.**

A Tabela 4 apresenta os resultados da triagem enzimática qualitativa realizada com os fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica*. Foram avaliadas enzimas hidrolíticas: amilase (amido), celulase (carboximetilcelulase), esterase, lipase, pectinase e protease. Para a lipase, foram utilizados dois substratos distintos — Tween® 20, Tween® 80 — a fim de observar possíveis variações na expressão enzimática em função da natureza do indutor avaliado.

**Tabela 4-** Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos de *Coffea arabica*.

Código do isolado	Amilase (IE)	Pectato liase (IE)	Celulase (IE)	Protease (IE)	Lipase (IE)	
					(Tween® 20)	(Tween® 80)
CfP1A1B	-	-	-	-	1,24	1,01
CfP1F1C	-	-	1,11	-	-	-
CfP1F3A	-	-	-	-	1,07	1,30
CfP1F3A1	-	-	-	-	1,03	-
CfP2F1C	-	-	1,97	1,25	-	-
CfP2F2B	1,04	1,13	1,24	-	<b>3,43</b>	-
CfP2F2D	-	-	1,07	-	1,37	1,08
CfP2F3B	-	-	-	1,15	1,62	1,23
CfP2F3C	-	-	-	-	1,60	-
CfP3F1A1	-	-	-	-	1,43	1,14
CfP3F1A2	-	-	-	1,12	<b>2,62</b>	1,81
CfP3F1C1 Branco	-	-	1,05	1,23	1,39	-
CfP3F1C1 colorido	-	-	1,03	-	1,30	-
CfP3F1C2 Branco	-	-	-	-	1,03	-
CfP3F1C2 Colorido	-	-	1,26	-	1,34	-
CfP3F1D1	-	-	-	1,15	-	-
CfP3F1D2	-	-	-	-	1,28	-
CfP3F2A	-	-	-	-	1,26	1,70
CfP3F2B	-	-	-	-	1,11	0,68
CfP3F2B1	-	-	-	-	1,47	1,09
CfP3F2B2	-	-	-	1,18	-	-
CfP3F3C	-	-	-	-	-	-
CfP3F2C1	-	-	-	-	-	-
CfP3F2C2	-	-	-	1,15	<b>2,02</b>	1,77
CfP3F2D1	-	-	-	1,12	1,31	1,27
CfP3F2D2	-	-	-	-	1,45	-
CfP4F1A1	-	-	1,05	1,07	1,94	-
CfP4F1A2	-	-	0,87	-	1,08	0,97
CfP4F3A1	-	-	-	-	1,35	-
CfP4F3A2	-	-	-	-	<b>4,40</b>	-
CfP4F1B1	-	-	-	-	<b>5,37</b>	1,20
CfP4F1B2	-	-	-	-	1,97	-
CfP4F2A1	-	-	-	1,17	<b>3,73</b>	-
CfP4F2A2	-	-	-	1,13	-	-
CfP4F2A3	-	-	-	1,48	1,27	-
CfP4F2A4	-	-	0,96	-	1,84	-
CfP4F4A1	-	-	-	1,00	1,21	-
CfP4F3B1	-	-	-	-	-	1,10
CfP4F3B2	-	-	-	-	<b>4,81</b>	1,24
CfP4F2B1	-	-	-	1,07	-	-
CfP4F3B3	-	-	-	1,09	<b>4,5</b>	-
CfP4F2B2	-	-	1,06	-	-	-

Fonte: Do autor (2025).

Legenda (-): não apresentou halo de inibição

A triagem enzimática realizada com os 43 fungos endofíticos isolados revelou variações na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, conforme apresentado na Tabela 4. Dos 45

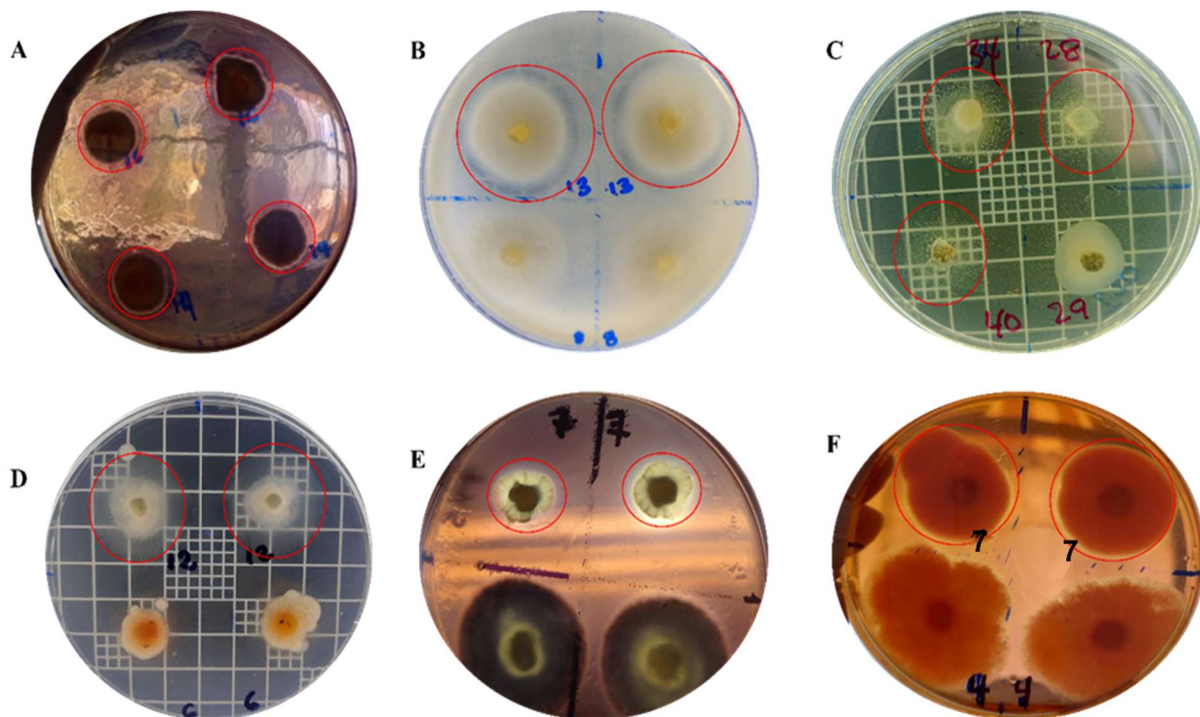
isolados obtidos inicialmente, dois não apresentaram crescimento durante o processo de reativação e, portanto, não foram incluídos nos ensaios enzimáticos. A atividade foi avaliada com base no índice enzimático (IE), sendo considerados como indicativos de atividade significativa os valores iguais ou superiores a 2,0 em meio sólido, medindo os resultados positivos conforme ilustra a Figura 11.

Os ensaios enzimáticos realizados com os fungos endofíticos isolados demonstraram a capacidade desses microrganismos em produzir diferentes enzimas hidrolíticas (Figura 11). Na atividade celulolítica (Figura 11A), os isolados CfP3F1C2 (ponto 16) e CfP3F1C1 (ponto 14) apresentaram índices enzimáticos (IE) de 1,26 e 1,03 respectivamente, mesmo sendo valores baixos, essas duas cepas apresentaram certa capacidade de degradar celulose. A atividade lipolítica frente ao Tween® 80 - esterase (Figura 11D) foi positiva para o isolado CfP3F1A2 (ponto 12), com IE de 1,81. Por outro lado, a atividade lipolítica utilizando Tween® 20 como substrato (Figura 11C) foi observada nos isolados CfP4F2A1 (ponto 34; IE 3,73), CfP4F1A1 (ponto 28; IE 1,94), CfP4F3B2 (ponto 40; IE 4,81) indicando elevado potencial lipolítico.

A atividade amilolítica (Figura 11F) foi detectada no isolado CfP2F2B (ponto 7; IE 1,04), demonstrando capacidade de degradação de amido. Na atividade proteolítica (Figura 11B), o isolado CfP3F1C1 (ponto 13; IE 1,23), observou-se a formação de halo de hidrólise proteica e pectatoliase (Figura 11E) com um só fungo CfP2F2B (ponto 7; IE 1,13). Entre as enzimas testadas, a atividade lipolítica foi a mais frequente e expressiva, com diversos isolados apresentando IE elevados, especialmente nos ensaios com o substrato Tween® 20. O isolado CfP4F1B1 destacou-se com um IE de 5,37 para lipase, seguido pelos isolados CfP4F3B2 e CfP4F3B1, com IE de 4,81 e 4,50, respectivamente. Esses valores indicam forte capacidade de produção de lipases extracelulares em condições de cultivo sólido.

A atividade lipolítica esteve presente em um total de 78,6% dos fungos estudados em Tween® 20 (33 de 43 fungos endofíticos) e 38,1% dos fungos em Tween® 80, de acordo ao com o Gráfico 1. A predominância da atividade lipolítica entre os fungos endofíticos isolados de *C. arabica* está de acordo com a literatura, que destaca a abundância de compostos lipídicos e cerosos em tecidos de café (Murthy e Naidu, 2012). Estudos anteriores também relataram uma alta frequência de atividade lipolítica em isolados endofíticos de café, como observado por Monteiro *et al.* (2020), que relataram obtiveram 88,8% dos isolados positivos de fungos endofíticos do gênero *Induratia*.

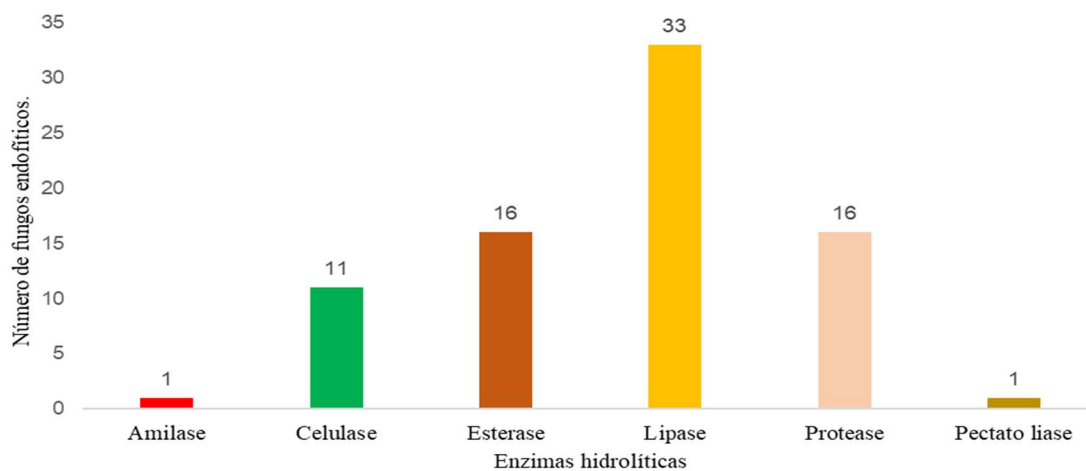
**Figura 11**– Fotografia de placas indicando as atividades enzimática de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica*.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: (A) Atividade celulolítica (ponto 16: CfP3F1C; ponto 14: CfP3F1C1). (B) Atividade proteolítica (ponto 13: CfP3F1C1). (C) Atividade lipolítica (ponto 34: CfP4F2A1; ponto 28: CfP4F1A1; ponto 40: CfP4F3B1). (D) Atividade esterase (ponto 12: CfP3F1A2). (E) Atividade pectato liase (ponto 7: CfP2F2B). (F) Atividade amilase (ponto 7: CfP2F2B).

**Gráfico 1**- Frequência da atividade enzimática da lipase, esterase, amilase, celulase, e protease e pectato liase para os endófitos isolados de *C. arabica*.



Fonte: Do autor (2025).

A alta produção de lipases pode estar diretamente relacionada às características bioquímicas do hospedeiro, considerando que os tecidos foliares do cafeeiro apresentam concentrações elevadas de compostos lipídicos, incluindo ceras epicuticulares e uma matriz rica em ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3), ácido linoleico (C18:2) e ácido oleico (C18:1), além de quantidades expressivas de oxilipinas derivadas da peroxidação de PUFA (Ácidos graxos poliinsaturados) como os fitoprostanos e fitofuranos, produtos de oxidação não enzimática do ácido linolênico como demonstrado por Crisafulli e Navarini (2023), e o determinado na revisão de Hoseini *et al.* (2021).

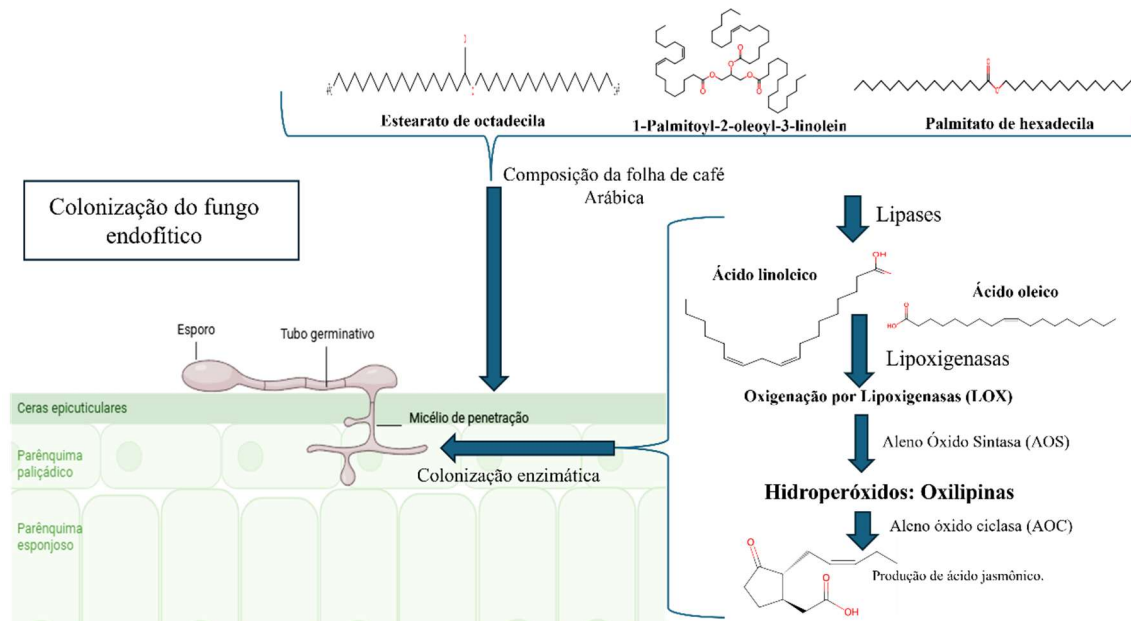
A presença constante desses compostos hidrofóbicos nas folhas de café não apenas funciona como barreira física e química contra estressores ambientais, mas também serve como sinal molecular e substrato para os endófitos, que, para colonizar de forma eficiente esse microambiente, ativam rotas metabólicas associadas à síntese de lipases extracelulares. De acordo com Usman *et al.* (2023) e Kuzniak e Gajewska (2024), as lipases são uma das principais enzimas extracelulares sintetizadas por endófitos, desempenhando um papel ecológico fundamental na colonização de tecidos vegetais hidrofóbicos, além de apresentarem grande relevância para aplicações industriais, especialmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de detergentes e biocombustíveis (Castro *et al.*, 2004)

Este padrão também reflete uma tendência observada na revisão de Durán *et al.* (2021), sobre bioprospecção de subprodutos do café, que destaca enzimas como lipases e proteases como ferramentas-chave na bioconversão de biomassa e no desenvolvimento de processos sustentáveis. Assim, nossos resultados reforçam a hipótese de que a predominância da atividade lipolítica nos endófitos de *C. arabica* representa uma adaptação ecológica fortemente correlacionada à composição lipídica de seus tecidos foliares, consolidando esses microrganismos como fontes promissoras de lipases para diversas aplicações biotecnológicas.

As demais atividades hidrolíticas estudadas, como amilase e pectinase (pectato liase) com 2,3%, celulase 25,6% e protease com 37,2% foram pouco frequentes entre os 43 fungos endofíticos avaliados. A análise dos índices enzimáticos determinou que a grande maioria dos isolados fúngicos apresentou uma baixa taxa de produção extracelular dessas enzimas por esses microrganismos isolados neste estudo, pelo menos quando cultivados em meio sólido, conforme observado no Gráfico 2A. O Gráfico 2B mostra valores menores de índices enzimáticos  $IE < 2$ . No entanto, essa baixa atividade pode estar relacionada ao tipo de ambiente onde esses fungos vivem, o interior das folhas de *C. arabica* e possa ser interpretado como o

indica a Figura 12, inicialmente, como uma limitação fisiológica como estratégia adaptativa para evitar a ativação da imunidade vegetal (Jones e Dangl, 2006).

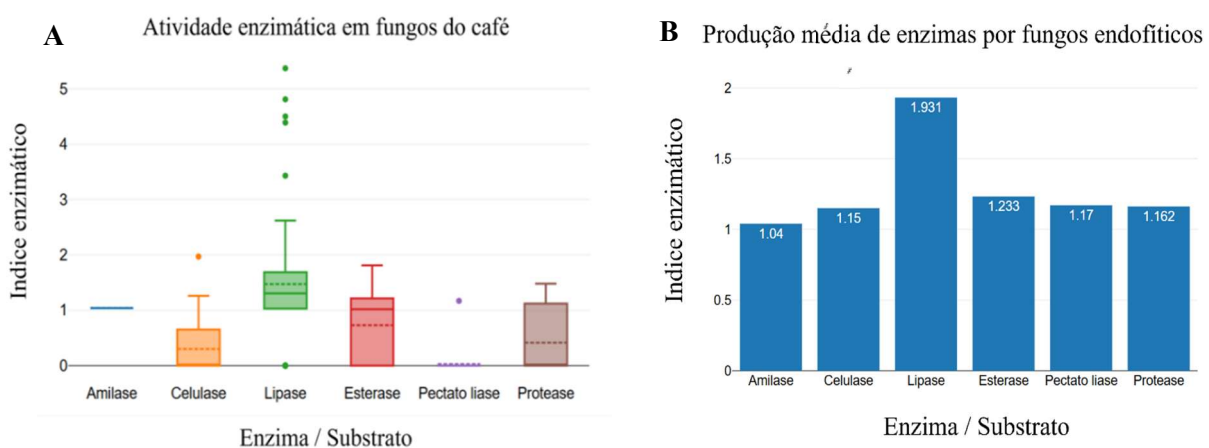
**Figura 12.** Interação bioquímica planta-fungo durante a colonização endofítica em *C. arabica*.



Fonte: Do autor (2025). Figura criada em Biorender.com.

Legenda: Representação da colonização endofítica mediada por enzimas, na qual a degradação de lipídios foliares libera ácidos graxos que ativam a via da lipoxigenase e a sinalização do ácido jasmônico.

**Gráfico 2-** Produção e variabilidade da atividade enzimática de fungos endofíticos de café.

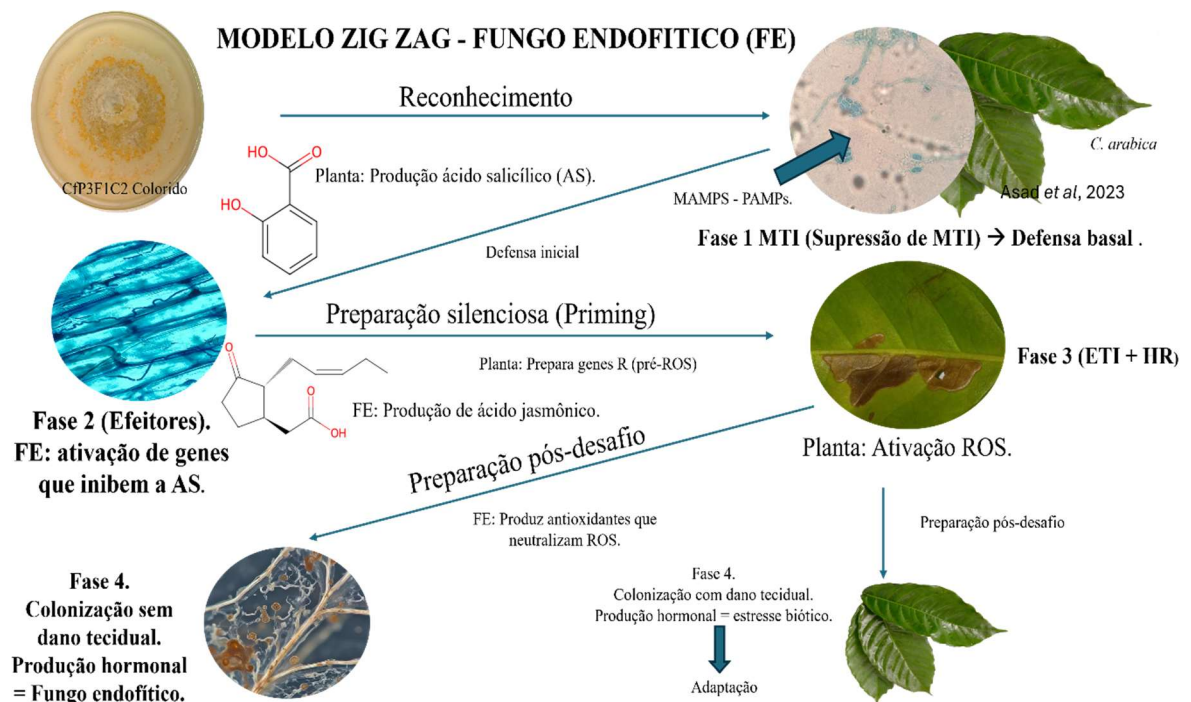


Fonte: Do autor (2025).

Legenda: Gráfico (A). Indica a atividade enzimática, ; Gráfico (B). Indica a atividade média das enzimas estudadas.

Segundo o modelo “zig-zag” de Jones e Dangl (2006), a liberação de fragmentos derivados de parede celular vegetal ou fúngica MAMPs (Padrões moleculares associados a micróbios) / PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) por enzimas microbianas pode ativar receptores de padrão (PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões) e desencadear imunidade basal (PTI - Imunidade desencadeada por padrões). Portanto, reduzir a produção de enzimas como amilases, celulases, pectinases e proteases pode ser uma forma de os microrganismos permanecerem "invisíveis" ao sistema imune da planta (Figura 12 e 13).

**Figura 13.** Esquema do mecanismo de ação em ziguezague de fungos endofíticos associados à *C. arabica* na ativação de respostas defensivas e proteção foliar.



Fonte: Adaptação de Kuzniak e Gajewska, 2024; Asad et al., 2023; Monteiro et al., 2020; Jones & Dangl, 2006

Legenda: Os endófitos induzem a produção de metabólitos secundários e ativam respostas imunes, como a imunidade desencadeada por efeitores (ETI) e a resposta de hipersensibilidade (HR), mediadas pelo ácido salicílico e pelo ácido jasmônico, contribuindo para a proteção foliar contra patógenos e processos de colonização.

Como explicam Dora *et al.* (2022), muitos microrganismos evitam produzir enzimas que degradam a parede celular da planta para não ativar o sistema de defesa da plantamesma. Produzir essas enzimas em excesso poderia fazer com que a planta reconhecesse o fungo como uma ameaça, rompendo a relação simbiótica, conforme mostrado na Figura 13 (Jones e Dangl, 2006). Adicionalmente, Asad *et al.* (2023) ressaltaram que muitos fungos endofíticos

associados ao cafeeiro promovem crescimento e proteção de plantas sem recorrer à degradação extensiva da parede celular, priorizando mecanismos de sinalização, modulação hormonal e produção de metabólitos secundários. Assim, a baixa atividade hidrolítica observada para amilase, celulase, pectinase e protease, neste estudo, pode refletir uma estratégia ecológica de colonização comensal ou mutualística.

#### **5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método do ágar em bloco.**

A atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos foi avaliada frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 09548), expressa como halo de inibição em milímetros conforme apresentado na Tabela 5. O isolado CfP1F3A apresentou o maior halo contra *S. aureus* (16,9 mm  $\pm$  0,2), seguido por CfP3F1A1 (11,5 mm  $\pm$  0,3), CfP2F2B (5,9 mm  $\pm$  0,1) e CfP4F4A1 (8,9 mm  $\pm$  1,3). Este último apresentou uma atividade de inibição média de 8,9 mm com um elevado desvio padrão (DP = 1,3), pois, uma das réplicas realizadas sob as mesmas condições, não apresentou atividade antimicrobiana. A ausência na duplicata aumentou a variabilidade entre os valores medidos. Em relação a *C. albicans*, apenas CfP4F4A1 apresentou atividade, formando um halo de 12,4  $\pm$  0,4 mm e no caso da *E. coli*, nenhum fungo endofítico apresentou atividade em pelo método do ágar em bloco. Esses resultados indicam que CfP1F3A apresentou ação contra uma bactéria Gram-positiva, enquanto CfP4F4A1 revelou atividade antifúngica frente à levedura patogênica.

A atividade antimicrobiana observada nos isolados CfP1F3A e CfP3F1A1 contra *S. aureus* (Figura 12) pode estar relacionada à produção de metabólitos secundários com afinidade pela parede celular bacteriana. As bactérias gram-positivas são ricas em peptidoglicanos (Sette *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2021; Do Espírito Santo *et al.*, 2023). Compostos como alcaloides, quinonas e terpenoides são frequentemente descritos na literatura como eficazes contra esse grupo bacteriano. No estudo de Guimarães *et al.* (2021) em plantas do café, foi demonstrado que fungos endofíticos do gênero *Induratia* apresentaram alta eficiência contra *S. aureus* devido à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) e metabólitos não voláteis, os quais inibiram o crescimento bacteriano e reduziram a formação de biofilme pré-existente. Esses compostos podem interferir em funções vitais da bactéria, como a integridade da membrana, a síntese proteica e a atividade enzimática, resultando em efeitos antibacterianos promissores para aplicações no controle biológico e na saúde pública.

**Tabela 5-** Índice de atividade antimicrobiana e antifúngica dos fungos endofíticos isolados.

Endófito	Patógeno - Halo antimicrobiano (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>C. albicans</i> (ATCC 09548)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
CfP1A1B	-	-	-
CfP1F1C	-	-	-
CfP1F3A	16,9±0,2	-	-
CfP1F3A1	-	-	-
CfP2F1C	-	-	-
CfP2F2B	5,9±0,1	-	-
CfP2F2D	-	-	-
CfP2F3B	-	-	-
CfP2F3C	-	-	-
CfP3F1A1	11,5±0,3	-	-
CfP3F1A2	-	-	-
CfP3F1C1	-	-	-
Branco	-	-	-
CfP3F1C1 colorido	-	-	-
CfP3F1C2	-	-	-
Branco	-	-	-
CfP3F1C2 Colorido	-	-	-
CfP3F1D1	-	-	-
CfP3F1D2	-	-	-
CfP3F2A	-	-	-
CfP3F2B	-	-	-
CfP3F2B1	-	-	-
CfP3F2B2	-	-	-
CfP3F3C	-	-	-
CfP3F2C1	-	-	-
CfP3F2C2	-	-	-
CfP3F2D1	-	-	-
CfP3F2D2	-	-	-
CfP4F1A1	-	-	-
CfP4F1A2	-	-	-
CfP4F3A1	-	-	-
CfP4F3A2	-	-	-
CfP4F1B1	-	-	-
CfP4F1B2	-	-	-

(Continuação)

Endófito	Patógeno - Halo antimicrobiano (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>C. albicans</i> (ATCC 09548)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
CfP4F1B2	-	-	-
CfP4F2A1	-	-	-
CfP4F2A2	-	-	-
CfP4F2A3	-	-	-
CfP4F2A4	-	-	-
CfP4F4A1	8.,9±1.,3	1.,2±0.,4	-
CfP4F3B1	-	-	-
CfP4F3B2	-	-	-
CfP4F2B1	-	-	-
CfP4F3B3	-	-	-
CfP4F2B2	-	-	-

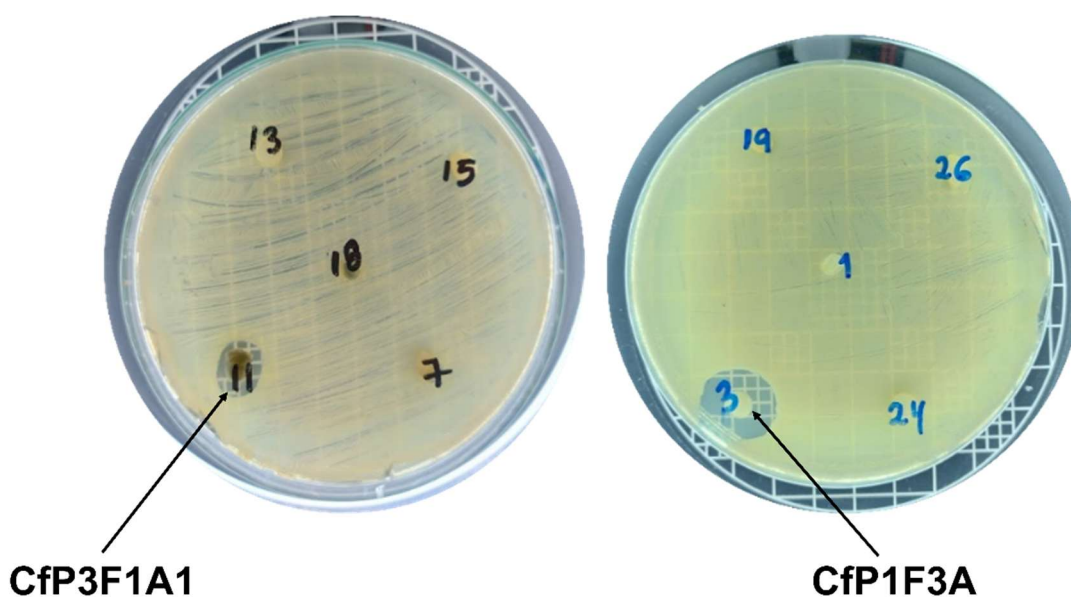
Fonte: Do autor (2025).

Legenda: (-) não foi detectado halo de inibição

Por outro lado, o isolado CfP4F4A1 (Figura 13), destacou-se frente a *Candida albicans*, indicando a possível produção de compostos com ação antifúngica, os quais podem atuar na síntese de ergosterol, na integridade da membrana ou na parede celular do fungo. Esse comportamento diferencial reflete a diversidade metabólica dos fungos endofíticos, que podem produzir substâncias bioativas específicas conforme o alvo biológico.

Devido aos compostos presentes na planta do café, trabalhos como os de Calheiros *et al.* (2023), mostraram extratos de café contra patógenos fúngicos que apresentaram atividade contra as espécies *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* (fungos dermatófitos), mas não demonstraram bons resultados contra espécies do gênero *Candida*. Entretanto, na discussão do estudo, os autores destacaram que compostos fenólicos presentes nos extratos, como os ácidos hidroxicinâmicos esterificados com ácido quínico, incluindo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico apresentou propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra *Candida*.

**Figura 14-** Fotografias de placas Petri com a presença de halos de inibição contra *S. aureus* por endófitos de café.



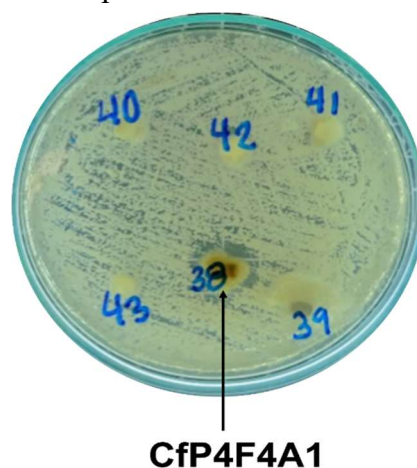
Fonte: Do autor (2025).

Legenda: As fotografias representam placas de Petri contendo meio BHI suplementado com 2% de ágar nutritivo, semeadas com *S. aureus* (ATCC 6538). As placas foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana de fungos endofíticos isolados de *C. arabica*. Halos de inibição do crescimento bacteriano são observados ao redor do ponto de inoculação dos isolados endofíticos, com destaque para o isolado CfP3F1A1 (11) e CfP1F3A (3).

Na Figura 13 foi possível observar a formação de halo de inibição ao redor do fungo CfP4F4A1 (ponto 38). Estudos como os de Kalinowska *et al.* (2018) e Suárez-Quiroz *et al.* (2013) confirmam a atividade antifúngica de compostos como o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e seus ésteres alquilados contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*, evidenciando inibição significativa do crescimento fúngico. Além disso, Bajko *et al.* (2016) demonstraram que esses extratos são capazes de reduzir de forma expressiva os níveis de ergosterol, quitina e  $\beta$ -(1,3)-glucano — componentes estruturais essenciais para a integridade e funcionalidade da célula fúngica. Em contraste, no presente trabalho, o isolado endofítico CfP4F4A1 apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*.

O trabalho de Lu *et al.* (2022) relataram que fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica* apresentaram ampla diversidade metabólica e capacidade de produzir compostos bioativos com potencial de controle biológico sobre fitopatógenos e microrganismos humanos. Embora o estudo não tenha testado diretamente espécies de *Candida*, os autores destacaram o potencial desses fungos para inibir uma ampla gama de patógenos através da produção de compostos fenólicos, terpenoides, alcaloides e COVs.

**Figura 15** - Halos de inibição de *C. albicans* para endófitos de café.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: As fotografias representam placas de Petri contendo meio BHI suplementado com 2% de ágar nutritivo, semeadas com *C. albicans* (ATCC 09548). Halo de inibição do crescimento de *C. albicans* ao redor do ponto de inoculação do isolado endofítico Cfp4F4A1 (38), evidenciando a atividade antifúngica do isolado.

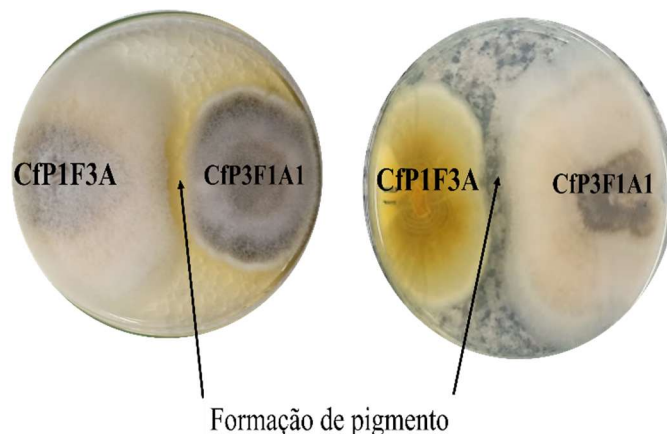
### **5.5 Co-cultura de isolados endofíticos de café com atividade antimicrobiana.**

Adicionalmente, neste trabalho, foi realizado um ensaio de co-cultura utilizando os isolados Cfp1F3A e Cfp3F1A1 (Figura 14), previamente selecionados por sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*. A interação fúngica observada na co-cultura resultou na formação de uma interface pigmentada (amarela), indicando uma possível ativação de rotas biossintéticas silenciosas, que não foram detectadas quando os isolados foram cultivados separadamente. Este fenômeno está de acordo com o que tem sido amplamente discutido na literatura sobre co-cultivo de fungos endofíticos (Knowles *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2024; Tironi *et al.*, 2024), onde a competição por espaço e nutrientes simula o ambiente natural, induzindo estresse metabólico e, conseqüentemente, a produção de metabólitos secundários não expressos em monoculturas.

A geração de pigmentos na interface dos micélios pode estar relacionada à produção de compostos fenólicos, quinonas ou melaninas, frequentemente associadas às funções ecológicas como defesa química e sinalização. Segundo Tironi *et al.* (2024), interações fúngicas podem desencadear a biossíntese de metabólitos com atividades antimicrobianas e antifúngicas, bem como a produção de pigmentos, resultado de um mecanismo de defesa ou competição. Além disso, Wu *et al.* (2024) demonstraram que co-culturas envolvendo *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata* associados ao cafeeiro resultaram na produção de novos derivados

cicloexenônicos com potente atividade antifúngica, que não foram detectados em culturas isoladas.

**Figura 16** - Co-cultura dos fungos endofíticos CfP1F3A e CfP3F1A1.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: Observa-se a formação de pigmento na região de contato entre as colônias (indicada pelas setas), sugerindo a ativação de vias metabólicas secundárias induzidas pela interação interespecífica. As diferenças de coloração e morfologia micelial entre os isolados refletem padrões distintos de crescimento e resposta à co-cultura.

Portanto, a formação de pigmentos observada na co-cultura dos isolados CfP1F3A e CfP3F1A1 sugere uma interação bioquímica relevante, com potencial geração de novos metabólitos de interesse biotecnológico. Esse resultado abre perspectivas para estudos futuros, visando a identificação e caracterização desses compostos.

## **5.6 Caracterização dos extratos de acetato de etila obtidos por fermentação estática e agitada.**

Diversos parâmetros de cultivo, como o modo de agitação (ou a sua ausência), a presença de  $\text{NaNO}_3$ , o pH e o tempo de fermentação, podem afetar o crescimento fúngico e a produção de metabólitos secundários, conforme destacado na revisão de Hashem *et al.* (2023). Segundo este autor, os fatores físico-químicos do meio (composição de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, agitação e tipo de substrato) constituem uma estratégia para otimizar a biossíntese de compostos bioativos, ativar vias metabólicas inativas e aprimorar o perfil químico dos extratos fúngicos.

O fungo endofítico CfP1F3A foi selecionado para ser cultivado em meio líquido por apresentar o maior halo de inibição contra *S. aureus* e apresentar um crescimento significativo em meio sólido, sugerindo potencial para produção de antimicrobianos. Neste estudo de bioprospecção, foram implementadas variações na presença da fonte de nitrogênio e nas condições físicas do meio de cultura, comparando o cultivo realizado em modo agitado e estático, em diferentes dias. Por se tratar de um estudo preliminar e exploratório, não foi realizado um planejamento experimental, em vez disso, foram feitas pequenas alterações para verificar se ocorriam mudanças, que poderiam ativar novas vias metabólicas e promover a produção de compostos distintos. Portanto, este trabalho foi exploratório e abre caminho para pesquisas futuras.

No cultivo em modo estático, realizou-se uma fermentação com nitrato e outra sem (fonte de  $\text{NaNO}_3$ ), conforme descrito na Tabela 6 e no Gráfico 3. Os cultivos foram finalizados nos dias 10, 15 e 20. Durante os primeiros 10 dias, sem adição ao meio de  $\text{NaNO}_3$  (F3E<sub>10</sub>S), o fungo apresentou baixa biomassa (0,098 g). O extrato acetato de etila (AcOEt) proveniente deste cultivo apresentou massa de 40 mg, o que pode ser resultado do estresse induzido pela limitação de nitrogênio (Widjajanti *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2025).

Após o 15º. dia de cultivo em meio estático, sem  $\text{NaNO}_3$  (F3E<sub>15</sub>S), o fungo apresentou uma biomassa de 0,389 g. Após estes cinco dias adicionais de cultivo, observou-se um aumento de 0,291 g, sugerindo que, na ausência de nitrato, o microrganismo continua a priorizar o crescimento micelial mesmo em condições de limitação de nitrogênio. Contudo, a produção de metabólitos extracelulares foi baixa, atingindo apenas 4 mg, indicando que a deficiência de nitrogênio favorece o crescimento, mas não a síntese de metabólitos secundários. Resultados semelhantes foram relatados por Widjajanti *et al.* (2022), que observaram uma relação inversa entre a disponibilidade de nitrogênio e a produção de metabólitos em condições de estresse por nitrogênio.

Por outro lado, no cultivo estático suplementado com nitrato, durante o mesmo período experimental, apresentou uma biomassa de 0,695 g, ou seja, 0,597 g a mais do que na condição com  $\text{NaNO}_3$  aos 15 dias (F3E<sub>15</sub>N). Esse aumento sugere que o fungo utiliza eficientemente o nitrogênio inorgânico para promover o crescimento micelial. Nessa condição, a produção de metabólitos atingiu 15 mg, indicando que, embora o nitrato estimule o acúmulo de biomassa, ele pode reduzir a pressão metabólica em direção à síntese de metabólitos secundários (Tudzynski., 2014; Krysenko e Wohlleben., 2024). E, após 20 dias de cultivo (F3E<sub>20</sub>S), com o meio estático sem  $\text{NaNO}_3$  houve um aumento na biomassa para 4,209 g, refletindo que o fungo

atingiu a fase estacionária, acumulando micélio, provavelmente devido à restrição de O<sub>2</sub> e ausência de estresse mecânico. A produção de metabólitos foi de 44 mg, a maior no cultivo estático, indicando maior biomassa, maturação do cultivo e, provavelmente, maior produção de metabólitos.

Em meio agitado, conforme mostrado na Tabela 6, os caldos foram avaliados após os dias 6, 12 e 18. No dia 6<sup>o</sup> (F3A<sub>6</sub>N), a biomassa apresentada foi baixa, de 0,022 g. talvez a agitação em 200 rpm, fez com que o micélio sofresse fragmentação mecânica, retardando seu crescimento inicial, mesmo assim, o extrato AcOEt apresentou massa de 16 mg. Possivelmente, o estresse físico estimulou vias metabólicas secundárias, como observado no trabalho de Ramirez-Villalobos *et al.* (2023), mas o fungo se encontrava no início de seu crescimento.

No 12<sup>o</sup> dia (F3A<sub>12</sub>N) houve um acúmulo de biomassa de 0,277 g, visto que o micélio já havia se adaptado à agitação. O extrato AcOEt apresentou massa de 32 mg. No 18<sup>o</sup> dia, a biomassa diminuiu para 0,082 g. De acordo com os trabalhos de Liu *et al.* (2021) e Suharsanti *et al.* (2022), a agitação pode esgotar o micélio em algumas espécies, diminuindo a biomassa, mas estimula a produção de metabólitos devido ao estresse físico. Neste estudo, foram obtidos 30 mg no 18<sup>o</sup> dia (F3A<sub>18</sub>N), o que está de acordo com outros estudos e possivelmente relacionado à ativação de vias metabólicas sob condições de estresse.

Em seguida, duas biomassas fúngicas foram selecionadas para realizar extrações com AcOEt para obtenção de extratos do micélio, originando extratos com substâncias presentes dentro das células, seus códigos F3E<sub>20</sub>S e F3A<sub>12</sub>N (Tabela 6), que foram duas cujas condições com geraram as maiores biomassas. A decisão de analisar o micélio baseou-se em estudos como os de Musthafa *et al.* (2021) e Wu *et al.* (2022). O maior rendimento deo extrato AcOEt foi para F3E<sub>20</sub>S<sub>M</sub> foi de (152 mg), enquanto, o maior rendimento; esse rendimento mais elevado permitiu a obtenção de quantidades suficientes de extrato para realizar análises químicas e atividades biológicas. Em comparação, o rendimento do extrato do micélio de F3A<sub>12</sub>N<sub>M</sub> foi de 26 mg. As atividades antimicrobianas dos extratos serão avaliadas em etapas futuras.

**Tabela 6** - Variáveis de cultivo, biomassa do endófito (g) e massas dos extratos AcOEt (mg) obtidas a partir do caldo de cultivo e do micéliodo fungo endofítico em após diferentes dias de fermentação.

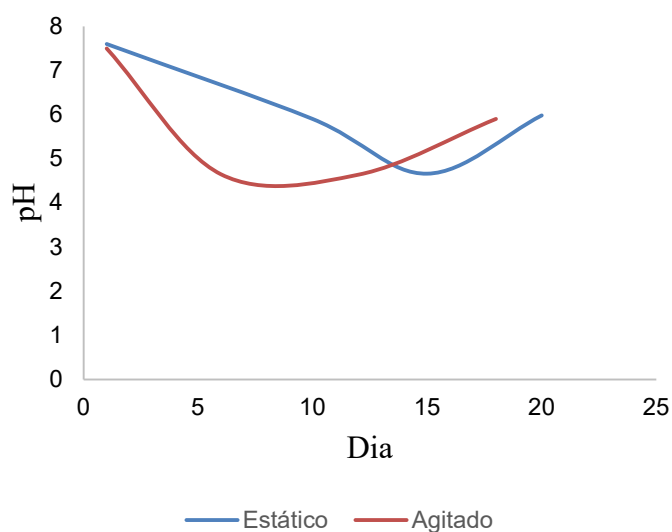
<b>Condição</b>	<b>Código</b>	<b>Dia</b>	<b>pH</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>AcOEt (mg)</b>
<b>Extrato AcOEt caldo</b>					
Estático sem NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>10</sub> S	10	5.9	0.098	40
Estático sem NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>15</sub> S	15	4.66	0.389	4
Estático com NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>15</sub> N	15	4.68	0.695	15
Estático sem NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>20</sub> S	20	5.98	4.209	44
Agitado com NaNO <sub>3</sub>	F3A <sub>6</sub> N	6	4.65	0.022	16
Agitado com NaNO <sub>3</sub>	F3A <sub>12</sub> N	12	4.64	0.277	32
Agitado com NaNO <sub>3</sub>	F3A <sub>18</sub> N	18	5.9	0.082	30
<b>Extrato AcOEt micélio</b>					
Estático sem NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>20</sub> S <sub>M</sub>	20	5.98	4.209	152
Agitado com NaNO <sub>3</sub>	F3A <sub>12</sub> N <sub>M</sub>	12	4.64	0.277	26

Fonte: Do autor (2025).

**Tabela 7** - Produção de biomassa fúngica e metabólitos secundários a partir do micélio de CfP1F3A a partir dos extratos F3E20S e F3A12N.

<b>Condição</b>	<b>Código</b>	<b>Dia</b>	<b>pH</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>AcOEt (mg)</b>
Estático sem NaNO <sub>3</sub>	F3E <sub>20</sub> S <sub>M</sub>	20	5.98	4.209	152
Agitado com NaNO <sub>3</sub>	F3A <sub>12</sub> N <sub>M</sub>	12	4.64	0.277	26

Fonte: Do autor (2025). **Gráfico 3-** Variações do pH do meio de cultivo durante o crescimento do fungo CfP1F3A em condições estáticas e agitadas.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: Variação de pH: linha azul = cultivo estático; linha vermelha = cultivo agitado

Em relação ao pH do caldo após o crescimento do fungo, ambas as condições apresentaram acidificação do meio, conforme indicado no Gráfico 3, característica de uma possível fase metabólica ativa associada à produção de ácidos orgânicos, seguida por um aumento parcial do pH nos últimos dias. Trabalhos como o de Li *et al.* (2025) relacionam o pH à produção de compostos antibacterianos pelo fungo endofítico *Rhizoctonia bicornis*, obtido da planta *Chisandra chinensis*, onde o pH 5,0 permitiu maior atividade antimicrobiana contra MRSA. Outros estudos, como o de Abdelghany *et al.* (2021), determinaram que o fungo endofítico *Aspergillus* obtido de uma alga apresentou produção de metabólitos em faixas de pH entre 6 e 4 e relataram que o extrato com maior citotoxicidade foi obtido após 21 dias de incubação estática; sua extração foi realizada utilizando acetato de etila. Esses estudos sugerem que a manipulação do pH permite simular as condições de estresse do ambiente natural do fungo (como o interior da planta), o que ativa os genes responsáveis pela produção de metabólitos de defesa.

Observou-se que o crescimento da biomassa no Gráfico 4 apresentou diferenças entre as condições estáticas (Gráfico 4A) e agitadas (Gráfico 4B). Em condições estáticas, o fungo passou por um período prolongado de desenvolvimento lento (dias 0–15), seguido por um aumento abrupto da biomassa no dia 20. Esse comportamento indica uma fase estendida de adaptação ao meio antes de entrar em crescimento acelerado. Por outro lado, no meio agitado praticamente não houve aumento de biomassa. Revisões como as de Venugopalan *et al.* (2015) e trabalhos como Hawar (2022) sugerem que a agitação pode provocar estresse mecânico,

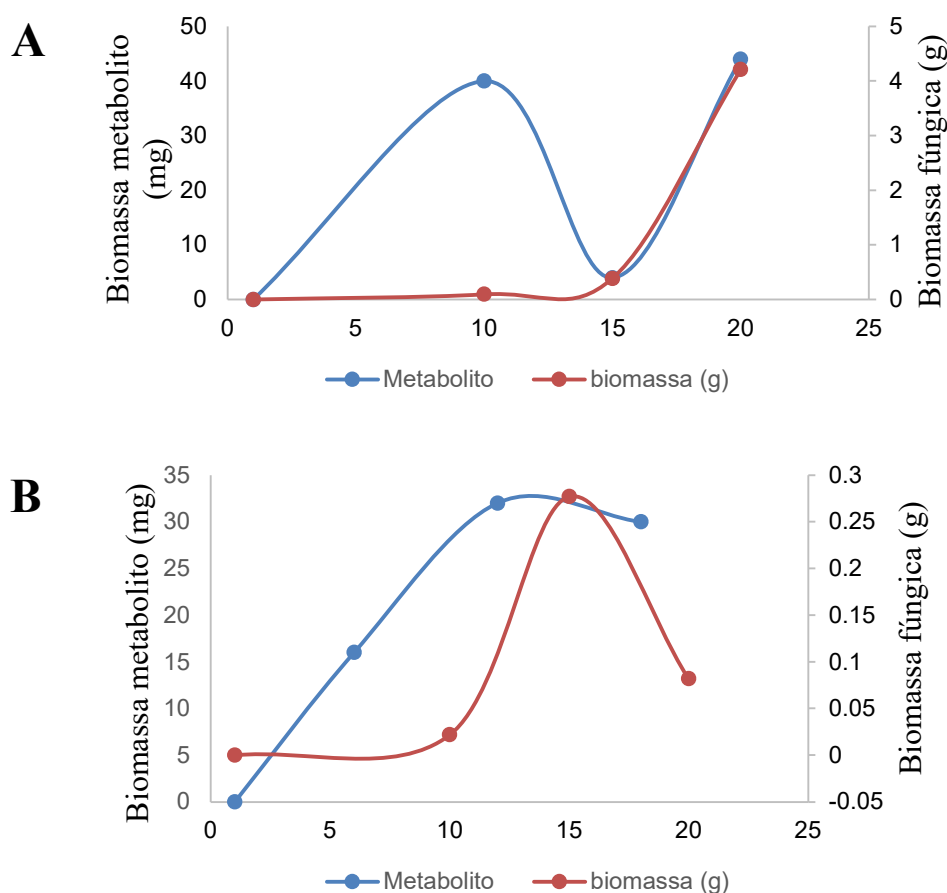
fragmentação hifal ou até mudanças na disponibilidade de oxigênio, fatores que dificultam a formação de um micélio denso e compacto.

No Gráfico 4 também se observa a evolução da produção de metabólitos secundários do fungo CfP1F3A nas duas condições fermentativas. Em cultivo estático, a biomassa aumentou até alcançar um valor elevado aos 20 dias, indicando que a ausência de agitação tende a gerar um microambiente mais estável, com menor estresse mecânico e maior possibilidade de formação de micélio agregado. Entretanto, a produção de metabólitos exibiu um padrão não linear, com um pico na fase intermediária e posterior queda abrupta. Esses resultados podem estar associados tanto a limitações de oxigênio quanto ao início de processos de autólise que reduzem a capacidade metabólica ativa do fungo (Hawar, 2022).

Nas condições agitadas, o comportamento foi distinto. Embora a biomassa não tenha aumentado de forma significativa, os metabólitos apresentaram um pico tardio e menos pronunciado. Esse padrão pode refletir o impacto da agitação sobre a fisiologia do fungo: além de fragmentar o micélio, a agitação pode acelerar o esgotamento de nutrientes ou favorecer a dispersão e até a degradação de metabólitos já formados (Venugopalan *et al.*, 2015). Assim, a sinalização celular envolvida na síntese de compostos secundários pode ser alterada, reduzindo sua produção máxima.

Os resultados reforçam que as condições estáticas beneficiaram o acúmulo de biomassa, enquanto a agitação pode ter produzido um estresse físico que modulou tanto o crescimento quanto o perfil metabólico. Essa comparação destaca a sensibilidade do fungo às condições físico-ambientais do cultivo e evidencia a importância de selecionar uma condição de fermentação que favoreça o microrganismo, seja para maximizar a biomassa ou para intensificar a produção de metabólitos.

**Gráfico 4** - Dinâmica da produção de biomassa e metabólitos secundários (extrato AcOEt) do fungo endofítico CfP1F3A.



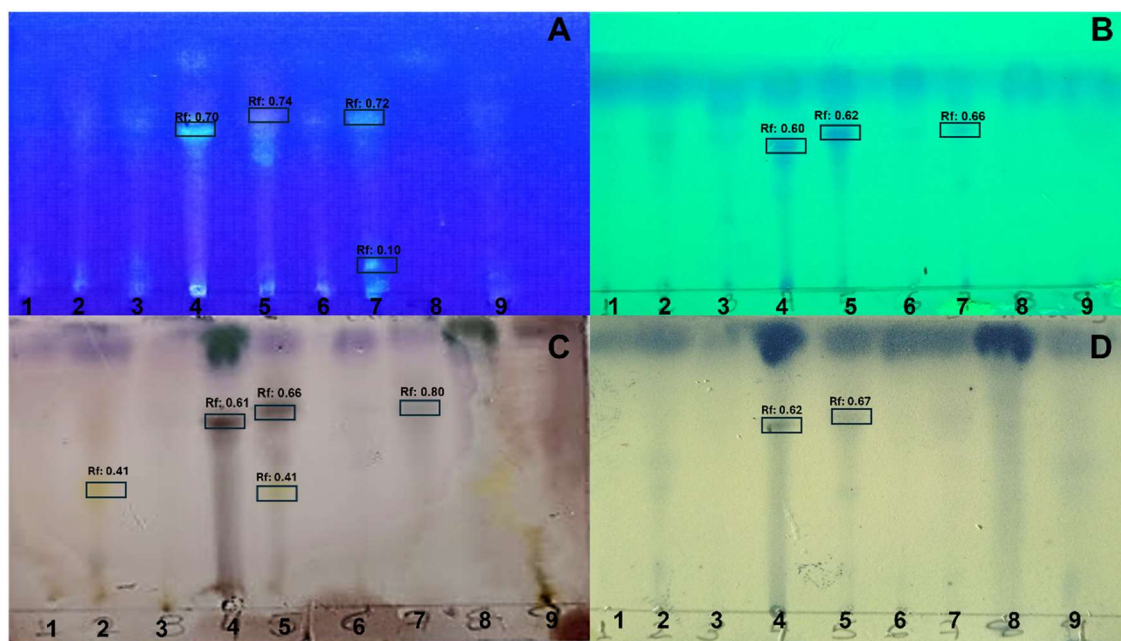
Fonte: Do autor (2025).

Legenda: A. Fermentação estática. B. Fermentação agitada

### 5.7 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) de extratos de CfP1F3A.

Na Figura 15, observam-se os perfis cromatográficos (CCDs) dos extratos AcOEt provenientes do cultivo do fungo CfP1F3A, em diferentes condições estática e agitada. As CCDs foram submetidas a diferentes revelações realizadas com reveladores físicos e químicos e organizadas em quatro painéis: (A) detecção sob luz UV a 365 nm, (B) detecção sob luz UV a 254 nm, (C) revelação com anisaldeído e (D) revelação com reagente fosfomolibdico. Cada placa de CCD contém todos os extratos (1–9, conforme mostrado na Tabela 78).

**Figura 17** - Perfil cromatográfico dos extratos por CCD.



Fonte: Do autor (2025).

Legenda: (A). UV em 365 nm. (B). UV em 254 nm (C). Anisaldeído (D). Fosfomolibdico. Identificação das amostras: 1. Fermentação estática sem  $\text{NaNO}_3$  por 10 dias; 2. Fermentação estática sem  $\text{NaNO}_3$  por 15 dias; 3. Fermentação estática com  $\text{NaNO}_3$  por 15 dias; 4. Fermentação estática sem  $\text{NaNO}_3$  por 20 dias; 5. Micélio proveniente de fermentação estática sem  $\text{NaNO}_3$  por 20 dias; 6. Fermentação agitada com  $\text{NaNO}_3$  por 6 dias; 7. Fermentação agitada com  $\text{NaNO}_3$  por 12 dias; 8. Micélio proveniente de fermentação agitada com  $\text{NaNO}_3$  por 12 dias e 9. Fermentação agitada com  $\text{NaNO}_3$  por 18 dias.

As placas de CCD representadas pelas fotografias 15 A e 15 B, reveladas, respectivamente, sob a luz em 365 e 254 nm apresentam manchas mais pronunciadas, principalmente nos extratos 4, 5 e 7, cujas manchas apresentam Rf (fator de retenção) indicado na Tabela 7. Os extratos 4 = (F3E<sub>20</sub>S<sub>M</sub>), 5 = (F3E<sub>20</sub>S) e 7 (F3A<sub>12</sub>N<sub>M</sub>) apresentam manchas com Rf muito próximas, sendo que 4 e 7 são extratos obtidos a partir do micélio e o 5, extrato obtido de uma fermentação estática avaliada após 20 dias de cultivo. Estas manchas indicam a presença de compostos que absorvem a luz nos respectivos comprimentos de onda devido a sistemas aromáticos (grupos cromóforos) que podem ser conjugados e rígidos, pelo menos os que emitem fluorescência. O mesmo foi indicado com a revelação com ácido fosfomolibdico (substâncias redutoras). Na revelação com anisaldeído, que revela diferentes tipos de compostos orgânicos, foi possível observar manchas escuras Rf entre 0,60 - 0,66 e manchas amarelas em valores de Rf ~ 0,41 nos extratos 2 e 5. A revelação com anisaldeído pode indicar a presença de diferentes compostos, por exemplo, manchas mais escuras (compostos fenólicos, terpenoides ou substâncias com grupos funcionais como aldeídos e cetonas) enquanto cores

mais claras como o amarelo pode indicar a presença de amins ou mesmo alcaloides, porém, as cores apresentadas irão depender da estrutura química da molécula avaliada.

A revisão de Kowalska *et al.* (2022) corrobora essa interpretação ao demonstrar que extratos fúngicos apresentam substâncias com cromóforos detectáveis a 254 nm, validando as observações realizadas. Assim, os perfis obtidos para F3E<sub>20</sub>S<sub>M</sub>, F3E<sub>20</sub>S e F3A<sub>12</sub>N<sub>M</sub> indicam a presença de estruturas químicas capazes de absorver nessa faixa do ultravioleta, geralmente associadas a anéis aromáticos ou sistemas conjugados.

A visualização a 365 nm (Figura 12.A) permite identificar seletivamente compostos capazes de emitir fluorescência, ou seja, a fluorescência é evidenciada pelos valores de R<sub>f</sub> observados para F3E<sub>20</sub>S<sub>M</sub>, F3E<sub>20</sub>S e F3A<sub>12</sub>N<sub>M</sub>. Uma resposta fluorescente indica a presença de estruturas moleculares altamente conjugadas ou compostos heterocíclicos que, quando excitados por luz ultravioleta, emitem luz característica. Esse comportamento é típico de vários metabólitos secundários fúngicos, como derivados fenólicos, alcaloides, polipeptídeos aromáticos e lactonas conjugadas, que apresentam sistemas  $\pi$  estendidos ou núcleos aromáticos substituídos capazes de estabilizar o estado excitado (Miller, 1999; Gao *et al.*, 2021).

Foram utilizados outros reveladores, como reagente de Dragendorff (alcaloides), FeCl<sub>3</sub> (fenólicos) e ninhidrina (aminas primárias e secundárias), não sendo observadas manchas características com cada um desses reveladores.

**Tabela 7** - Valores de Rf obtidos para os extratos CfP1F3A em diferentes métodos de visualização na CCD.

<b>Código</b>	<b>Número em CCD</b>	<b>254 nm</b>	<b>365 nm</b>	<b>Anisaldeído</b>	<b>Ácido fosfomolibdico</b>
F3E <sub>10</sub> S	1	-	-	-	-
F3E <sub>15</sub> S	2	-	-	0.41	-
F3E <sub>15</sub> N	3	-	-	-	-
F3E <sub>20</sub> S <sub>M</sub>	4	0.70	0.60	0.61	0.62
F3E <sub>20</sub> S	5	0.74	0.62	0.66	0.67
				0.41	
F3A <sub>6</sub> N	6	-	-	-	-
F3A <sub>12</sub> N <sub>M</sub>	7	0.72	0.66	0.80	-
		0.10			
F3A <sub>12</sub> N	8	-	-	-	-
F3A <sub>18</sub> N	9	-	-	-	-

Fonte: Do autor (2025).

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que os fungos endofíticos associados a *C. arabica* apresentam diversidade morfológica e metabólica relevante, evidenciada tanto na variabilidade de crescimento micelial quanto na capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos.

A triagem enzimática em meio sólido revelou predominância de atividade lipolítica (76,7%), indicando que lipases são, possivelmente, as enzimas mais amplamente secretadas pelos isolados. Em contraste, as atividades celulolítica (25,6%), proteolítica (37,2%) e especialmente amilolítica (2,3%) foram menos frequentes, o que pode estar relacionado a estratégias adaptativas de evasão da imunidade vegetal.

Na triagem antimicrobiana, três isolados apresentaram ação significativa: dois fungos, contra *S. aureus* (CfP1F3A e CfP3F1A1) e um contra *C. albicans* (CfP4F4A1), reforçando o potencial desses microrganismos como fontes de compostos com atividade antimicrobiana

frente a patógenos de interesse clínico. Adicionalmente, a avaliação morfológica revelou que 53,5% dos isolados apresentaram produção visível de pigmentos, sendo que 13 dos 43 fungos exibiram coloração marrom intensa, sugerindo potencial produção de melanina. Essa observação é respaldada por literatura recente, que associa a melanina fúngica à proteção contra estresses ambientais, além de destacar suas aplicações em cosméticos, embalagens biodegradáveis, eletrônica e saúde humana.

Adicionalmente, o ensaio de co-cultura entre os isolados CfP1F3A e CfP3F1A1 revelou uma interação fúngica caracterizada pela formação de pigmentos na interface dos micélios, indicando que a interação competitiva entre os fungos pode estimular a ativação de rotas biossintéticas específicas e a produção de novos metabólitos não observados em culturas isoladas.

A análise por CCD demonstrou apresentou de forma qualitativamente a influência das condições de cultivo no perfil metabólico do fungo CfP1F3A. Os extratos F3E<sub>20</sub>S<sub>M</sub>, F3E<sub>20</sub>S (estático) e F3A<sub>12</sub>N<sub>M</sub> (agitado) apresentaram metabólitos secundários com valores de R<sub>f</sub> entre 0,60 e 0,80, visíveis sob luz UV a 254 nm e 365 nm, e reativos com anisaldeído e ácido fosfomolibdico. Essas características físico-químicas sugerem a presença de sistemas conjugados e grupos funcionais compatíveis com metabólitos como policetídeos aromáticos, terpenoides oxigenados e compostos fenólicos, estabelecendo uma base sólida para seu subsequente isolamento e elucidação estrutural.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como etapas futuras, como ingressante no doutorado, pretende-se realizar:

- Realizar estudos de planejamento fatorial e aplicar a metodologia de superfície de resposta (MSR) para otimizar as condições de cultivo e fermentação de fungos endofíticos selecionados.
- Avaliação Avaliar da atividade antimicrobiana dos de todos os extratos obtidos pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) contra os patógenos humanos estudados.
- Identificação Identificar do fungo por microcultivo (gênero) e por biologia molecular (espécie) com ITS 4 e ITS 5.
- Avaliação Avaliar do perfil químico dos extratos por ressonância magnética nuclear (RMN) e por espectrometria de massas (EM).

- Avaliação Avaliar dos extratos obtidos quanto a atividade antioxidante.

Por ser um trabalho de bioprospecção, este estudo servirá como precursor para vários outros trabalhos de graduação e pós-graduação devido ao potencial promissor dos fungos endofíticos isolados do café para produção de biomoléculas. O cultivo do fungo promissor para produção de lipase e de antimicrobianos em meio líquido poderá ser objeto de estudos futuros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, E; KAVEH, S; & HASHEMI, S. M. B. Structure-based modification of  $\alpha$ -amylase by conventional and emerging technologies: Comparative study on the secondary structure, activity, thermal stability and amylolysis efficiency. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 437, 137903. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137903>. Acesso em: 20 may. 25

ABDELGHANI, Zainab, *et al.* Therapeutic applications and biological activities of bacterial bioactive extracts. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 8, p. 4755-4776. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02505-1> Acesso em: 12 nov. 25

ABIC (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ). Estatísticas do café. 2021. <https://estatisticas.abic.com.br/>. Acesso em: 29 jan. 25

ALDER-RANGEL, A. *et al.* The Third International Symposium on Fungal Stress - ISFUS. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 124, n. 5, p. 235-252, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.007> Acesso em: 27 abr. 24

ASAD, Suhail *et al.* Coffee-associated endophytes: plant growth promotion and crop protection. **Biology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 911, 2023. <https://doi.org/10.3390/biology12070911> Acesso em: 14 nov. 25

ASHOK, P. P. *et al.* Challenges and prospects of microbial  $\alpha$ -amylases for industrial application: a review. **World Journal Microbiology Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 44, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03821-y> Acesso em: 20 may. 25

BABU, S. *et al.* Exploring agricultural waste biomass for energy, food and feed production and pollution mitigation: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.] v. 360, p. 127-566, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127566> Acesso em: 29 abr. 24

BAGY M.M. *et al.* Isolation and characterization of pigment producing fungi. **Assiut University Journal of Multidisciplinary Scientific Research**, [s. l.] v. 52, p. 152-176, 2023. <https://doi:10.21608/aunj.2022.176419.1040> Acesso em: 17 jun. 25

BAJKO, E. K. *et al.* 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **Lwt**, [s.l.], v. 65, p. 471-479, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024> Acesso em: 17 jun. 25

BARCIELA, P; PEREZ-VAZQUEZ, A; PRIETO, M. Azo dyes in the food industry: Features, classification, toxicity, alternatives, and regulation. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 178, p. 113935, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113935> Acesso em: 17 feb. 25

BHATIA, T. *et al.* A Review on Cellulose Degrading Microbes and its Applications. **Industrial Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 26-39, 2024. <https://doi.org/10.1089/ind.2023.0025> Acesso em: 21 abr. 24

CALHEIROS, D. *et al.* Antifungal activity of spent coffee ground extracts. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 242, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020242> Acesso em: 16 nov. 2025

CASTRILLÓN, M. *et al.* Hongos: más allá de lo visible. **Revista Experimenta**, [s. l.], n. 15, p. 24 – 31, 2022. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/experimenta/article/download/349562/20807948/> Acesso em: 19 abr. 24

CASTRO, A; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais, **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 1, p.181-188, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031> Acesso em: 21 abr. 24

CASTRO, H. F. *et al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, p. 146-156, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100025> Acesso em: 14 jun. 25

CHEN, X. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1008-1025, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546667>. Acesso em: 29 abr. 24

CHENG, C. *et al.* The root endophytic fungus *Serendipita indica* improves resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 156, p. 87-100, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01863-3> Acesso em: 29 abr. 24

CHENG, X. F. *et al.* Effects of field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic fungi on fruit quality and soil properties of Newhall navel Orange. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 170, p. 104-308, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104308> Acesso em: 29 abr. 24

CRISAFULLI, P; NAVARINI, L. Cytoplasmic lipid droplets (LDs) occurrence in leaf tissues of different *Coffea* species: A new physiological trait in *coffee*. **Flora**, [s. l.], v. 305, p. 152349, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152349> Acesso em: 11 nov. 25

CRUZ, F. D. *et al.* Taxonomy, phylogeny, and preliminary screening of fungal isolates for cadmium tolerance from Iloilo Ferry Terminal, Iloilo, Philippines. **Studies in Fungi**, [s. l.] v. 10, n. 1, 2025. <https://doi.org/10.48130/sif-0025-0001>. Acesso em: 21 feb. 25

DABAJA, M. Z. *et al.* Avaliação da atividade enzimática de fungo endofítico isolado de *Annona crassiflora* (marolo) com interesse biotecnológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1-10, 2019. <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/5051> Acesso em: 29 abr. 24

DAVIS, A. *et al.* Lost and found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the forgotten coffee crop species of West Africa. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, p. 521-618, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00616> Acesso em: 28 abr. 2024

DE ANDRADE, A. *et al.* Antibacterial activity of endophytic fungi associated with *Aspidosperma subincanum* Mart. against Gram-positive bacteria. **DELOS: Desarrollo Local Sostenible**, [s. l.], v. 17, n. 53, p. e1346 – e1346, 2044. <https://ojs.revistadelos.com/ojs/index.php/delos/article/view/1346>. Acesso em: 28 abr. 2024

DE CAPRILES, C; MATA, S; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00437084> Acesso em: 22 abr. 2024

DE CARVALHO, F *et al.* Effects of Coffee arabica cultivation systems on tropical soil microbial biomass and activity in the northeast region of Brazil. **Agroforestry Systems**, [s. l.], v. 98, n. 7, p. 2397-2410, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10457-024-01026-2> Acesso em 15 nov. 2025

DESHMUKH, S. *et al.* Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 77, 2018. <https://doi.org/10.3390/jof7090780>. Acesso em: 27 jan. 2025

DÍAZ, A. F. *et al.* Café: un recorrido de la semilla a la taza. **Editorial Universidad de Caldas**, [s. l.], ed. 1. 2018. <https://muse.jhu.edu/pub/504/monograph/book/112843> Acesso em: 17 abr. 2024

DO ESPÍRITO SANTO, B. *et al.* Antitumor and antibacterial activity of metabolites of endophytic *Colletotrichum siamense* isolated from coffee (*Coffea arabica* L. cv IAPAR-59). **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 2651-2661, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01104-0> Acesso em: 18 jun. 25

DORA, S; TERRETT, O; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. Plant–microbe interactions in the apoplast: Communication at the plant cell wall. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1532-1550, 2022. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac040> Acesso em: 15 jun. 25

DURAN, D. *et al.* Scientometric overview of coffee by-products and their applications. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7605, 2021. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7605> Acesso em: 15 jun. 28

DZURENDOVA, S. *et al.* Mucoromycota fungi as powerful cell factories for modern biorefinery. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 101-115, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11720-1> 15 jun. 25

ESPOSITO, E; AZEVEDO, L. Fungos, Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. Caxias do Sul, EDUCS, [s. l.], p. 215-242, 2004. <https://repositorio.usp.br/item/001458671> Acesso em: 28 abr. 24

EL-SAYED, R. *et al.* A new endophyte *Monascus ruber* SRZ112 as an efficient production platform of natural pigments using agro-industrial wastes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 12611, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16269-1> Acesso em: 18 jun. 25

FERNANDES, M. *et al.* Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 45, p. 677–685, 2009. [10.1590/S1984-82502009000400010](https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000400010). Acesso em: 21 mar. 24

FLORENDO, P. Microbial Identification and Population Successions in the Novel Carabao Hydrolysis Pretreatment of Agriculture Crops Lignocelluloses Intended for Cellulose Ethanol Production. **CLSU International Journal of Science & Technology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 23-48, 2022. <https://doi.org/10.22137/ijst.2022.v6n1.03> Acesso em: 17 abr. 2024

FNCC (FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA). Estadísticas cafeteras. **Federación Nacional de Cafeteros de Colombia**, (2024). Disponível em: <https://federaciondecafeteros.org/wp/estadisticas-cafeteras/> Acesso em: 30 jan. 25

FONTANA, D. *et al.* Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. **Pathogens**, [Basel, Switzerland] v. 10, n. 5, p. 570, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050570> Acesso em: 28 abr. 24

FOWDEN, L. The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino-acids separated by paper chromatography. **Biochemical Journal**, [s. l.] v. 48, n. 3, p. 327, 1951. <https://doi.org/10.1042/bj0480327> Acesso em: 24 de nov. 2025

FREITAS, V. *et al.* Influence of roasting levels on chemical composition and sensory quality of Arabica and Robusta coffee: A comparative study. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 59, p. 104171. 2024. ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104171> Acesso em: 21 may. 25

FU, X *et al.* Geographic variation in fungal diversity associated with leaf spot symptoms of *Coffea arabica* in Yunnan, China. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 16, p. 1568029, 2025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1568029> Acesso em: 14 nov. 25

GAO, Shiyu, et al. From coconut petiole residues to fluorescent carbon dots via a green hydrothermal method for Fe<sup>3+</sup> detection. **Cellulose**, [s. l.], vol. 28, no 3, p. 1647-1661, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03637-1> Acesso em: 17 nov. 2025

GARVIN, D. The Italian coffee triangle: From Brazilian colonos to Ethiopian colonialisti. **Modern Italy**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 291 –312, 2021. <https://doi:10.1017/mit.2021.26> Acesso em: 3 jun. 2025

GOMEZ, O; LUIZ, J. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes, **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 21, p. 9105-9119, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9344-3> Acesso em: 28 abr. 2024

GONZALEZ, M; MORIN, V; LABRA, N; CASTRO, A. La industria de la celulosa y su impacto en la población: Desde lo social a lo bioquímico. **Revista interamericana de ambiente y turismo**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 179-188, 2021. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-235X2021000200179> Acesso em: 27 abr. 2024

GUIMARÃES, S. *et al.* Polyphasic characterization and antimicrobial properties of *Induratia* species isolated from *Coffea arabica* in Brazil. **Mycological Progress**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1457-1477, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01743-3> Acesso em: 18 jun. 2025

GUPTA, Vijai Kumar; TUOHY, Maria G. (Ed.). Laboratory Protocols in Fungal Biology; Fungal biology. **Springer Cham**, [s. l.], v. 4, p. 39-58, 2022. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-83749-5> Acesso em: 21 nov. 2025

HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, [s. l.] v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019782> Acesso em: 27 abr. 24

HASAN, F; SHAH, A; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**, [s. l.], v. 27, p. 782–798, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001> Acesso em: 27 abr. 24

HASHEM, H. *et al.* Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review. **Microbial cell factories**, [s. l.], vol. 22, no 1, p. 107, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02118-x> Acesso em: 16 nov. 25

HAWAR, S. Extracellular enzyme of endophytic fungi isolated from Ziziphus spina leaves as medicinal plant. **International Journal of Biomaterials**, [s. l.], v. 2022, n. 1, p. 2135927, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2135927> Acesso em: 17 nov. 25

HOSEINI, M. *et al.* Coffee by-products derived resources. **A review. Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 148, p. 106009, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106009> Acesso em: 14 jun. 25

IRE, F. *et al.* Isolation, Screening and Time Course Study of Amylase-producing Fungi from Garri Processing Environment. **Journal of Life and Bio Sciences Research**, [s. l.], v. 1, n. 02, p. 68-75, 2020. <https://doi.org/10.38094/jlbrs1325> Acesso em: 16 Sept. 25

JONES, J., DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05286> Acesso em: 15 jun. 25

KALINOWSKA, Monika, *et al.* The study of anti-/pro-oxidant, lipophilic, microbial and spectroscopic properties of new alkali metal salts of 5-o-caffeoylquinic acid. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n 2, p. 463, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19020463> Acesso em: 17 jun. 25

KHARWAR, R. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1np00008j>. Acesso em: 27 jan. 25

KMIOTEK, M; DYBKA-STĘPIEŃ, K; KARMAZYN, A. Mild enzymatic treatment of bleached pulp for tissue production. **Bioresources**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 4221-4236. 2021. <https://doi.org/10.15376/biores.16.2.4221-4236> Acesso em: 28 abr. 2024

KNOWLES, L. *et al.* Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. **Natural product reports**, [s. l.], v. 39, n 8, p. 1557-1573, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1NP00070E> Acesso em: 20 jun. 25

KORSA, G. *et al.* Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 13. 2023. <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w> Acesso em: 29 abr. 2024

KOWALSKA, Teresa; SAJEWICZ, Mieczysław. Thin-layer chromatography (TLC) in the screening of botanicals—its versatile potential and selected applications. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, no 19, p. 6607, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27196607> Acesso em: 17 nov. 2025

KRAVCHENKO, I; TIKHONOVA, E; SEMENOV, V. Temperature sensitivity of litter and soil organic matter decomposition: perspective of soil microbial community structure and function. **Microbes in Land Use Change Management**. Elsevier, [s. l.], p. 1-43, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824448-7.00004-8> Acesso em: 28 abr. 24

KRYSENKO, Sergii; WOHLLEBEN, Wolfgang. Role of carbon, nitrogen, phosphate and sulfur metabolism in secondary metabolism precursor supply in *Streptomyces* spp. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1571, 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081571> Acesso em: 15 nov. 2025

KUŹNIAK, E; GAJEWSKA, E. Lipids and lipid-mediated signaling in plant–pathogen interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 13, p. 7255, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25137255> Acesso em: 13 jun. 2025

LI, M. *et al.* Optimization of Fermentation Conditions for Endophytic Fungi from *Schisandra chinensis* and Investigation of Their Antibacterial Mechanisms Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 982, 2025. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13050982> Acesso em: 17 nov. 2025

LI, Z. *et al.* Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 1153, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24021153> Acesso em: 29 jan. 25

LINTON, S. The structure and function of cellulase (endo- $\beta$ -1, 4-glucanase) and hemicellulase ( $\beta$ -1, 3-glucanase and endo- $\beta$ -1, 4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 240, p. 110354, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110354> Acesso em: 28 abr. 2024

LIU, X. *et al.* Biotransformation ability of endophytic fungi: from species evolution to industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 105, p. 1-19, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11554-x> Acesso em: 29 abr. 2024

LIU, W. *et al.* Development of a new bioprocess for clean diosgenin production through submerged fermentation of an endophytic fungus. **ACS omega**, [s. l.], vol. 6, no 14, p. 9537-9548, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00010> Acesso em: 16 abr. 2025

LU, L. *et al.* Endophytic fungi associated with coffee leaves in China exhibited in vitro antagonism against fungal and bacterial pathogens. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 698, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8070698> Acesso em: 30 jan. 25

MAITIG, A; ALHOOT, M; TIWARI, K. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 4, 2018. <http://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.42> Acesso em: 16 Sept. 25

MARCELLANO, P; COLLANTO, A; FUENTES, G. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the bark of *Cinnamomum mercadoi*. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2017. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.3.69> Acesso em: 6 jun. 25

MARIN, J. M; SILVA, S. S; LUIZ, J. H. H. **Avaliação do potencial lipítico de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica***. In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - Minas Gerais (ERSBQ-MG). Anais. Diamantina(MG) UFVJM, 2024. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/ersbq2024/899479-avaliacao-do-potencial-lipolitico-de-fungos-endofiticos-isolados-de-coffee-arabica/> Acesso em: 3 jun. 2025

MARTÍNEZ-MEDINA, G. A. *et al.* Exploration of potential of different fungi in protease production and analysis of capacity to produce active peptides. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 274-281. 2024. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00199-8> Acesso em: 30 abr. 2024

MENDES, A. A. *et al.* Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 50, p. 503–511, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.020> Acesso em: 27 abr. 2024.

MILLER, Harris R. Color filter array for CCD and CMOS image sensors using a chemically amplified thermally cured pre-dyed positive-tone photoresist for 365-nm lithography. **Advances in Resist Technology and Processing XVI**. SPIE, p. 1083-1090, 1999.

MINAS GERAIS. Governo do Estado. Semana Internacional do Café: Minas segue como maior produtor de café do Brasil. 2023. Disponível em: <https://www.mg.gov.br/agricultura/noticias/semana-internacional-do-cafe-minas-segue-como-maior-produtor-de-cafe-do-brasil>. Acesso em: 15 set. 2025.

MISHRA, R. C. *et al.* Characterization of an endophytic strain *Talaromyces assiutensis*, CPEF04 with evaluation of production medium for extracellular red pigments having antimicrobial and anticancer properties. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 665702, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665702> Acesso em: 20 jun. 25

MONDAL, S. *et al.* Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, [s. l.], v. 45, p. 102 – 509, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102509>. Acesso em: 20 may. 25

MONTEIRO, M. *et al.* Enzyme production by *Induratia* spp. isolated from coffee plants in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 20180673, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020180673> Acesso em: 24 abr. 2024

MORAES, G; FERRAZ, L; CHAPLA, V. Compostos orgânicos voláteis de fungos endofíticos e suas aplicações biotecnológicas. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1498-1510, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20200116> Acesso em: 28 abr. 2024

MOURÃO, Bárbara et al. Total phenolic content and antioxidant capacity in *Muscodor* spp. inoculated seedlings of coffee cultivars of Brazil. **Coffee Science**, [s. l.], p. e202337, 2025. <https://doi.org/10.25186/v20i.2337> Acesso em: 13 jul. 25

MURTHY, Pushpa S.; NAIDU, M. Madhava. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, n. 3, p. 897-903, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z> Acesso em: 29 dic. 25

MSENYA, H. N. *et al.* The Potential of Fungi as Bio-Control Agents in Managing *Colletotrichum Kahawae* in Kenya. **Current Agriculture Research Journal**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2021. <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.9.3.04>. Acesso em: 30 jan. 25

MUSTHAFSA, S. *et al.* Intracellular reactive oxygen species scavenging activity and lipid peroxidation inhibition by secondary metabolites isolated from the endophytic fungus, *Daldinia eschscholtzii*. **Research Square**, [s. l.], v. 1, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-391337/v1> Acesso em: 16 nov. 2025

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. **Macmillan**, 2011.

OIC (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CAFÉ). Informe del mercado de café [2024]. Disponível em: <https://ico.org/es/what-we-do/world-coffee-statistics-database/>. Acesso em: 29 jan. 25

PETIT. *et al.* Combined ImmunoCAP and Western Blot for the Diagnosis of *Aspergillus* Lung Disease. **Mycoses**, [s. l.], v. 68, n. 4, 2025. <https://doi.org/10.1111/myc.70058> Acesso em: 14 jun. 25

PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], 1986, v. 87, no 4, p. 647-651, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80109-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80109-7) Acesso em: 5 jan. 25

PESEK, S; SILAGHI-DUMITRESCU, R. The Iodine/Iodide/Starch Supramolecular Complex. **Molecules**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 641, 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29030641> Acesso em: 3 jun. 25

PEREIRA, D. *et al.* Isolation and identification of pigment-producing endophytic fungi from the Amazonian species *Fridericia chica*. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 77, 2024. <https://doi.org/10.3390/jof10010077> Acesso em 28 jul. 25

PERUZZOLO, M; DA CRUZ, B; RONQUI, L. Polinização e produtividade do café no Brasil. **Pubvet**, [s. l.], v. 13, p. 152, 2019. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a317.1-6> Acesso em: 27 jan. 25

PIOTR, K. *et al.* Characterization of Arabica and Robusta coffees by ion mobility sum spectrum. **Sensors**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 3123, 2020. <https://doi.org/10.3390/s20113123> Acesso em: 29 may. 25

POHANKA, M. Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 616, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/616>. Acesso em: 2 abr. 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616> Acesso em: 26 jun. 25

RAGHAV, D; JYOTI, A; SIDDIQUI, A; SAXENA, J. Plant-associated endophytic fungi as potential bio-factories for extracellular enzymes: Progress, Challenges and Strain improvement with precision approaches. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 133, n. 2, p. 287-310, 2022. <https://doi.org/10.1111/jam.15574> Acesso em: 27 abr. 2024

RAJESH, P; RAVISHANKAR, V. Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 120-124, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.01.002> Acesso em: 28 abr. 2024

RAMÍREZ, L; LOZANO, L. Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. **Nova**, [s. l.], v. 18, no 33, p. 73-100, 2020. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701> Acesso em: 12 jun. 2025

RAMÍREZ-VILLALOBOS, Jesica María, et al. Effect of Culture conditions of *Lophocereus Marginatus* Endophytic Fungi on yield and anticancer and antioxidant activities. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], vol. 20, no 5, p. 3948, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijerph20053948> Acesso em: 16 nov. 2025

RUEGGER, M; TAUKE-TORNISIELO, S. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil, **Brazilian Journal of Botany**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200001> Acesso em: 27 abr. 2024

RUTA, Lavinia Liliana; FARCASANU, Ileana Cornelia. Coffee and yeasts: From flavor to biotechnology. **Fermentation**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 9, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010009> Acesso em: 15 nov. 2025

SABI, G. *et al.* Production of environmentally friendly plasticizers derived from soybean oils using biochemical (lipases) and chemical catalysts—Performance in flexible PVC films. **Process**

**Biochemistry**, [s. l.], v. 154, p. 63-74. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.04.013>  
Acesso em: 3 jun. 25

SENA, I. *et al.* *Euterpe oleracea* Mart (açazeiro) from the Brazilian Amazon: A novel font of fungi for lipase production. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2394, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122394> Acesso saem: 27 abr. 2024

SENANAYAKE, I. *et al.* Morphological approaches in studying fungi: Collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/20> Acesso em: 21 nov. 2025

SETTE, L. *et al.* Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 22, p. 1185-1195, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2> Acesso em: 18 jun. 25

SILVA, S. S. **Fungos endofíticos isolados de Coffea: avaliação do potencial lipolítico**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2024.

SOLÍS- PEREZ, A. L. *et al.* Hongos endófitos en la agricultura: caso cafeto. **Acta Agrícola y Pecuaria**, [s. l.], v. 9, n 1, 2023. <https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/616> Acesso em: 28 abr. 2024

SOPALUN, K; IAMTHAM, S. Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 134, p. 273–279, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.005> Acesso em: 28 abr. 2024

SOUZA, I. M; BASSI, G. J; LUIZ, J. H. H; HIRATA, D. B. Isolation and screening of extracellular lipase-producing endophytic fungi from *Handroanthus impetiginosus*. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.9734/AJB2T/2018/43014> Acesso em: 26 abr. 2024

STANISZEWSKA, M. *et al.* Candida albicans morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.] v. 44, p. 813-821, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000056> Acesso em: 21 nov. 2025

SUÁREZ-QUIROZ, M. *et al.* Anti-Aspergillus activity of green coffee 5-O-caffeoylquinic acid and its alkyl esters. **Microbial pathogenesis**, [s. l.], 2013, v. 61, p. 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.005> Acesso em: 18 jun. 25

SUHARSANTI, R; WAHYUONO, S; ASTUTI, P. Physical and chemical fermentation conditions affect the growth and metabolite production of endophytic fungi *Athelia rolfsii*. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 85-91, 2022.

SURYANARAYANAN, T. S. *et al.* Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, [s. l.], v. 54, n. 1, p.19–30, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0168-7> Acesso em: 28 abr. 2024

SUTAONEY, P. *et al.* Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], p. 130639, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130639> Acesso em: 28 abr. 2024

SUTHAR, M; DUFOSSÉ, L; SINGH, S. The enigmatic world of fungal melanin: a comprehensive review. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n 9, p. 891. 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9090891> Acesso em: 19 jun. 2025

TEATHER, M; WOOD, J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982> Acesso em: 9 jan. 2025

TEMPORITI, M; NICOLA, L.; NIELSEN, E; TOSI, S. Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, p. 1180, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180> Acesso em: 21 abr. 2024

TERESIA, N. *et al.* Isolation and morphological characterization of endophytic fungi isolated from mangrove plants along the Kenyan coastline. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 14, n 10, p. 594-607, 2020. <https://doi.org/10.5897/AJMR2020.9402> Acesso em: 12 jun. 25

TORRES, M. *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological research**, [s. l.], v. 182, p. 31-39, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005> Acesso em: 21 nov. 2025

TIRONI, L. *et al.* Endophytic Fungi co-culture: an alternative source of antimicrobial substances. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n 12, p. 2413, 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122413>. Acesso em: 20 jun. 2025

TUDZYNSKI, Bettina. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 5, p. 656, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00656> Acesso em: 16 nov. 2025

USMAN, M. *et al.* A review on endophytic fungi: a natural source of industrial enzymes. **Asian Journal of Plant Biology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 7-11, 2023. <https://doi.org/10.54987/ajpb.v5i1.820> Acesso em: 13 jun. 25